



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Pharmacologie des Récepteurs*

Présentée et soutenue par *Claire SANCHEZ*
Le 14 Mai 2012

Titre : *Le récepteur CCK2 dans les cancers:
Ciblage diagnostique et thérapeutique grâce à la vectorisation de nanoparticules
magnétiques*

JURY

Président: *Pr Thierry LEVADE, Professeur des Universités, INSERM U1037, Toulouse*
Rapporteur: *Dr Philippe DETERRE, Directeur de Recherche, INSERM UMR-S 945, Paris*
Rapporteur: *Pr Sébastien LECOMMANDOUX, Professeur des Universités, ENSCBP UMR 5629, Pessac*
Examineur: *Dr Catherine MOLLEREAU-MANAUTE, Directeur de Recherche, IPBS, Toulouse*

Ecole doctorale : *Biologie-Santé-Biotechnologies*
Unité de recherche : *Université Toulouse III, Equipe EA 4552*
Directeur(s) de Thèse : *Dr Daniel FOURMY*
Rapporteurs : *Dr P. Deterre, Pr S. Lecommandoux*

*A mon Père,
qui malgré son absence
aura été présent à chaque instant*

RESUME

Le récepteur CCK2 est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G. D'un point de vue physiologique, le récepteur CCK2 joue un rôle central dans la régulation de la digestion, et agit également au niveau du système nerveux central. D'un point de vue pathologique, il est impliqué dans la carcinogenèse digestive, et il est surexprimé dans les tumeurs neuroendocrines. Il constitue donc une cible diagnostique et thérapeutique potentielle pour ces cancers.

Dans un premier temps, nous avons recherché l'existence de variants de ce récepteur dans les tissus tumoraux issus de patients atteints de tumeurs qui expriment le RCCK2. Cette étude a permis de mettre en évidence un nouveau variant d'épissage, délété de l'exon 2, qui code pour une protéine possédant 5 domaines transmembranaires. Dans la cellule, ce variant est localisé uniquement dans le réticulum endoplasmique. Lorsqu'il est co-transfecté avec le récepteur sauvage, il exerce un rôle de dominant négatif sur l'expression membranaire du RCCK2, en entraînant sa rétention dans le réticulum endoplasmique. Ce phénomène se traduit par une diminution de l'activité biologique du récepteur sauvage.

Dans un deuxième temps, nous avons développé un outil pour cibler les tumeurs qui surexpriment le récepteur CCK2, basé sur l'utilisation de nanoparticules magnétiques qui sont utilisées comme agent de contraste en IRM. Pour cela nous avons greffé le ligand gastrine du RCCK2 à la surface des nanoparticules. Les nanoparticules vectorisées s'accumulent dans les cellules de façon dépendante du récepteur. L'internalisation des nanoparticules requière l'intervention de la β -arrestine 2, de la clathrine et de la dynamine. Nous avons montré que la présence de la nanoparticule ne modifiait pas les mécanismes d'internalisation du ligand dans les cellules, en revanche elle modifie la cinétique le recyclage lent (minoritaire) du RCCK2. L'accumulation tumorale des nanoparticules vectorisées a également été analysée *in vivo* suite à leur injection chez des souris nudes transplantées avec des xénogreffes de cellules tumorales qui expriment le RCCK2.

Enfin, nous avons contribué à montrer qu'un autre récepteur à 7 domaines transmembranaires, celui du GIP (glucose-dependent insulintropic polypeptide), est surexprimé dans certains types de tumeurs neuroendocrines. En outre ce récepteur est surexprimé dans 90% des tumeurs endocrines qui échappent au diagnostic par la somatostatine radiomarquée. Ces résultats posent la question du rôle du récepteur GIP dans le contexte tumoral et en font une nouvelle cible potentielle en cancérologie.

ABSTRACT

The CCK2 receptor belongs to the family of seven transmembrane domain G protein coupled receptors. From a physiological point of view, the CCK2 receptor exerts a central role in digestion regulation, and also acts on the central nervous system. From a pathological point of view, it was reported to be involved in digestive cancer development and overexpressed in neuroendocrine tumors. CCK2R is a potential diagnostic and therapeutic target of these cancers.

Firstly, we searched for receptor variants in tumors overexpressing CCK2R. We discovered a new splice variant of the CCK2R deleted of exon 2 and coding for a putative five-transmembrane domain receptor. Ectopic expression cells revealed that this variant lacks biological activity due to its sequestration in the endoplasmic reticulum. When co-expressed with the intact CCK2R, this variant diminished membrane density of the CCK2R and CCK2R-mediated activity, acting as a dominant negative on membrane density of the wild-type receptor.

Secondly, we developed CCK2R positive neuroendocrine tumor targeting with magnetic nanoparticles. We grafted a synthetic replicate of the CCK2R ligand, gastrin, on the nanoparticles. Targeted nanoparticles uptake is receptor dependant, and requires involvement of β -arrestine 2, clathrine and dynamine. We demonstrated that the nanoparticle did not modify ligand internalization in cells, but changes the kinetic of CCK2R intracellular traffic. Tumor accumulation of the targeted nanoparticles was assessed *in vivo* in mouse bearing tumor xenografts overexpressing CCK2R.

Finally, we collaborated on a project demonstrating that another G protein coupled receptor, the GIP receptor (glucose-dependent insulintropic polypeptide) was overexpressed in neuroendocrine tumors with a high density and incidence. Interestingly this receptor was detected in most somatostatin receptor-negative tumors. These results underlined a likely role of GIPR in tumoral carcinogenesis, and potential target for clinical applications in particular for *in vivo* scintigraphy and targeted radiotherapy.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	5
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	8
CHAPITRE I : LES TUMEURS NEUROENDOCRINES.....	9
<i>A/ Caractéristiques communes aux tumeurs neuroendocrines.....</i>	<i>9</i>
<i>B/ Epidémiologie des tumeurs neuroendocrines.....</i>	<i>10</i>
<i>C/ Techniques de diagnostic actuelles des tumeurs neuroendocrines</i>	<i>10</i>
C.1. Anatomopathologie	11
C.2. Imagerie conventionnelle.....	13
C.3. Imagerie isotopique	14
C.3.1. Scintigraphie MIBG	14
C.3.2. Scintigraphie des récepteurs de la somatostatine (SRS).....	14
C.3.3. Tomographie par émission de positrons (PET)	15
<i>D/ Thérapies actuelles des tumeurs neuroendocrines</i>	<i>16</i>
D.1. Chirurgie.....	16
D.2. Traitements anti-sécrétoires médicaux	16
D.3. Chimiothérapie	17
D.4. Radiothérapie métabolique.....	17
<i>E/ Exemples de tumeurs neuroendocrines : Biologie, diagnostic et thérapie.....</i>	<i>19</i>
E.1. Carcinome Médullaire de la Thyroïde (MTC).....	19
E.2. Insulinomes	21
E.3. Cancers du poumon à petites cellules (SCLC)	22
E.4. Tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST)	23
<i>F/ Surexpression de récepteurs couplés aux protéines G dans les tumeurs : Cibles diagnostiques et thérapeutiques.....</i>	<i>27</i>
F.1. Récepteurs couplés aux protéines G surexprimés dans les tumeurs neuroendocrines et les GIST	27

F.2. Développement de radio-ligands pour cibler les cancers surexprimant les récepteurs couplés aux protéines G	29
F.2.1. Récepteur de la somatostatine (sst2)	29
F.2.2. Autres exemples de récepteurs	30
F.2.3. Développement d'antagonistes radiomarqués.....	31
F.2.4. Récepteur CCK2	31
CHAPITRE II : LE RECEPTEUR CCK2	32
<i>A/ Les ligands du Récepteur CCK2.....</i>	32
A.1. Les ligands naturels : la Cholecystokinine (CCK) et la Gastrine	32
A.1.1. Structure et maturation	32
A.1.2. Cellules endocrines sécrétant la Gastrine et la CCK.....	34
A.2. Les ligands synthétiques.....	34
<i>B/ Le Récepteur CCK2, un membre de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)</i>	35
B.1. Clonage et structure	35
B.2. Transduction du signal.....	37
B.3. Internalisation du récepteur CCK2	40
B.3.1. Implication de l'extrémité C-terminale et rôle des β -arrestines	40
B.3.2. Devenir du récepteur dans la cellule.....	42
B.4. Dimérisation du récepteur CCK2	44
<i>C/ Distribution tissulaire et effets physiologiques du récepteur CCK2.....</i>	44
C.1. Distribution tissulaire	44
C.1.1. Expression au niveau du système digestif	44
C.1.2. Expression au niveau du système nerveux central	45
C.2. Effets physiologiques de la gastrine et de la CCK médiés par le récepteur CCK2	46
C.2.1. Rôle physiologique de la CCK	46
C.2.1.1. Au niveau du système digestif.....	46
C.2.1.2. Au niveau du système nerveux central	46
C.2.2. Rôle physiologique de la Gastrine.....	47
C.2.2.1. Rôle dans la digestion.....	47
C.2.2.2. Action trophique	47

<i>D/ Le récepteur CCK2 dans les cancers</i>	47
D.1. Implication tumorale dans les cancers digestifs	47
D.1.1. Cancers gastriques	48
D.1.2. Cancers pancréatiques	48
D.1.3. Cancers colorectaux	48
D.2. Variants du récepteur CCK2 identifiés dans les cancers digestifs	49
D.3. Surexpression du récepteur CCK2 dans les tissus tumoraux	52
D.4. Développement de radio-ligands pour la scintigraphie du récepteur CCK2.....	53

CHAPITRE III : LES NANOPARTICULES, NOUVELLE PLATEFORME DIAGNOSTIQUE ET THERAPEUTIQUE.....55

<i>A/ Exemples de nanoparticules développées pour des applications biomédicales</i>	57
A.1. Nanoparticules organiques	57
A.1.1. Liposomes et nanoparticules polymériques	57
A.1.2. Dendrimères	58
A.1.3. Nanotubes de carbone.....	60
A.2. Nanoparticules inorganiques	63
A.2.1. Quantum Dots.....	63
A.2.2. Nanoparticules d'Or	64
A.2.3. Nanoparticules magnétiques.....	65
<i>B/ Nanoparticules d'oxyde de fer</i>	67
B.1. Superparamagnétisme et Imagerie par Résonance Magnétique (IRM).....	67
B.2. Thérapie	69
B.2.1. Transport d'agents chimiothérapeutiques.....	70
B.2.2. Hyperthermie	72
B.3. Biodistribution des nanoparticules et influence de leurs caractéristiques physico- chimiques	77
B.3.1. Adressage passif	77
B.3.1.1. Système réticulo-endothélial (RES)	77
B.3.1.1.a. Définition	77
B.3.1.1.b. Influence de l'enrobage et de la charge de surface des nanoparticules.....	78

Introduction
Générale

Actuellement, la médecine est confrontée à la difficulté du diagnostic des cancers, ainsi qu'à la faible efficacité des traitements disponibles. C'est pourquoi il est essentiel d'explorer de nouvelles voies thérapeutiques, notamment grâce au ciblage des traitements anti-cancéreux.

La découverte de la surexpression de récepteurs peptidiques dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus normaux a suscité un intérêt croissant au cours de ces dernières années. Parmi ces cibles pharmacologiques, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) occupent une place prépondérante. Les RCPG constituent la plus grande famille de récepteurs membranaires et régulent, directement ou indirectement, tous les processus physiologiques de l'organisme. Ils sont également impliqués dans de nombreuses pathologies, incluant les cancers. C'est pourquoi ils constituent aujourd'hui la cible d'environ 30% des médicaments.

Les efforts de recherche de notre laboratoire se sont concentrés sur la pharmacologie et l'implication tumorale d'un RCPG, le récepteur CCK2. Le récepteur CCK2 transmet les effets de deux peptides: la gastrine et la cholecystokinine (CCK), qui participent à la régulation de la digestion, la modulation de la prise alimentaire et l'effet anti-nociceptif des opioïdes au niveau du système nerveux central. D'autre part, le récepteur CCK2 exerce une action proliférative dans plusieurs cancers digestifs. Certains variants du récepteur CCK2 identifiés dans ces cancers ont également montré un potentiel oncogénique. De plus, ce récepteur est surexprimé dans un grand nombre de tumeurs neuroendocrines. Il constitue donc une cible pharmacologique de choix pour le diagnostic et la thérapie de ces tumeurs.

Actuellement, la seule thérapie efficace pour les tumeurs neuroendocrines repose sur la chirurgie, à condition que ces néoplasies soient diagnostiquées à un stade où elles sont encore localisées. Or dans la moitié des cas elles sont diagnostiquées tardivement, ce qui implique la présence de métastases. De plus, les traitements de chimiothérapie conventionnelle sont peu efficaces. Le développement de nouvelles approches médicales est donc souhaitable. La surexpression de plusieurs types de RCPG, dont le récepteur CCK2, constitue l'une des caractéristiques des tumeurs neuroendocrines. Cette particularité a permis une avancée majeure dans la prise en charge de ces tumeurs. En effet ce phénomène a conduit au développement de ligands peptidiques radiomarqués, qui permettent le ciblage du diagnostic par scintigraphie et de la radiothérapie. Des analogues radio-marqués de gastrine et de CCK sont actuellement en cours d'évaluation pré-clinique et clinique, et ont produit des résultats encourageants.

Parallèlement aux radio-ligands, le développement des nanotechnologies dans le domaine de la médecine est actuellement en plein essor. En particulier, l'utilisation des

nanoparticules s'avère très prometteur pour les applications biomédicales. Leurs propriétés physiques intrinsèques uniques en font de puissants outils pour l'imagerie et la thérapie thermique, et leur taille nanométrique permet leur utilisation en tant que transporteur de médicaments. De récentes études montrent l'intérêt grandissant des nanoparticules magnétiques pour le diagnostic des cancers par IRM. L'imagerie par IRM est une technique de diagnostic très utilisée car elle est non invasive. Afin d'améliorer sa sensibilité, les nanoparticules d'oxyde de fer sont actuellement utilisées comme agent de contraste. D'un point de vue thérapeutique, les nanoparticules magnétiques permettent le transport de médicaments et constituent des vecteurs pour la thérapie par hyperthermie. Les efforts actuels de la recherche se concentrent en particulier sur l'optimisation de leurs propriétés physico-chimiques, afin d'améliorer la biodistribution et l'efficacité de ciblage des nanoparticules. L'ajout de ligands ou d'anticorps à la surface des nanoparticules permet théoriquement de les adresser de façon spécifique aux tissus cancéreux. Cette stratégie s'appelle la vectorisation.

Dans notre travail, nous nous sommes d'abord intéressés à l'expression du récepteur CCK2 dans les tumeurs neuroendocrines, et plus particulièrement à la recherche de variants de ce récepteur dans les tissus qui le surexpriment. Ces travaux ont conduit à la découverte d'un nouveau variant d'épissage du RCCK2, que nous avons caractérisé d'un point de vue pharmacologique.

Dans un contexte de recherche de nouvelles cibles pharmacologiques, notre équipe étudie également la pharmacologie moléculaire du récepteur GIP et travaille au développement de nouveaux ligands pour ce récepteur. Le RGIP est un RCPG qui appartient à la famille des récepteurs à incrétines, de même que le récepteur GLP-1 (glucagon-like peptide-1). Ces récepteurs sont exprimés dans les cellules β du pancréas, et sont impliqués dans la régulation de l'homéostasie glucidique en stimulant la sécrétion d'insuline en réponse à la prise alimentaire. De plus, le récepteur GLP-1 étant massivement exprimé dans plusieurs tumeurs neuroendocrines, en particulier dans les insulinomes, nous avons voulu définir l'expression du récepteur GIP dans ces tumeurs.

Dans la troisième partie de mes travaux de thèse, nous avons choisi de développer un système permettant de cibler le diagnostic et la thérapie des tumeurs qui surexpriment le récepteur CCK2, grâce à la vectorisation de nanoparticules magnétiques avec le ligand de ce récepteur. Nous avons étudié l'interaction des nanoparticules avec les cellules qui expriment le RCCK2, les mécanismes impliqués dans l'internalisation de ce système, et le potentiel diagnostique et thérapeutique de ces nanoparticules.

Introduction

Bibliographique

Chapitre I : Les tumeurs neuroendocrines

Depuis 2000, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a redéfini les tumeurs neuroendocrines digestives par le terme de tumeurs endocrines, ce qui n'est pas le cas des tumeurs pulmonaires et thymiques qui conservent la terminologie de tumeurs neuroendocrines. Dans un souci de clarté, le terme tumeur neuroendocrine sera utilisé dans ce manuscrit pour qualifier l'ensemble des tumeurs digestives et pulmonaires.

Après une introduction sur les tumeurs neuroendocrines et leur épidémiologie, ce chapitre expose de manière non exhaustive les différentes techniques utilisées actuellement pour le diagnostic et la thérapie de ces pathologies. De plus, quelques exemples de tumeurs neuroendocrines exprimant une forte densité de récepteurs CCK2 sont approfondis. Les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST), également caractérisées par une forte densité de récepteur CCK2, ont été incluses dans cette partie bien qu'elles ne soient pas classifiées comme des tumeurs neuroendocrines. La dernière partie de ce chapitre aborde le ciblage radiothérapeutique qui découle de la surexpression des récepteurs couplés aux protéines G dans les tumeurs.

A/ Caractéristiques communes aux tumeurs neuroendocrines

Les tumeurs neuroendocrines sont définies par l'expression de protéines de structure et de produits hormonaux communs aux neurones et aux cellules endocrines. Cette définition englobe un groupe de tumeurs dérivées de l'endoderme, également appelées gastro-entéro-pancréatiques, ou dérivées du neuroectoderme. Les tumeurs neuroendocrines partagent des caractéristiques communes qui font leur singularité, comme la variété des grades histopronostiques, la capacité de sécrétions hormonales, la multiplicité de marqueurs biologiques, la place prépondérante de l'imagerie scintigraphique fonctionnelle, ou encore l'hypervascularisation comme vecteur de qualité de l'imagerie conventionnelle.

Les tumeurs neuroendocrines sont des tumeurs rares, développées aux dépens des glandes endocrines (hypophyse, thyroïde, surrénale) ou des populations de cellules endocrines dispersées au sein de nombreux organes (tube digestif, pancréas, poumons...). Certaines

d'entre elles se rencontrent même dans des organes dépourvus de populations significatives de cellules endocrines normales, comme le thymus, le foie, les vésicules biliaires, le rein ou l'utérus [1]. Ces tumeurs sont hypervascularisées et bien différenciées dans la moitié des cas (45-55%) [2].

Les tumeurs neuroendocrines peuvent apparaître de façon sporadique ou dans un contexte de syndrome héréditaire autosomique dominant, telle que la néoplasie endocrine multiple (MEN : Multiple Endocrine Neoplasia). Il existe 4 syndromes de MEN impliqués dans l'apparition de tumeurs neuroendocrines héréditaires : MEN I, MEN II, la maladie de Von Hippel-Lindau (VHL) et le complexe de Carney. La plupart des prédispositions au développement d'une tumeur neuroendocrine a été corrélée à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur, sauf dans le MEN II qui provient de l'activation dominante d'un proto-oncogène. MEN II englobe trois sous-types cliniques, MEN IIA, MEN IIB et les carcinomes médullaires de la thyroïde familiaux (FMTC), qui aboutissent au développement d'un carcinome médullaire de la thyroïde (MTC : Medullary Thyroid Carcinoma) [3].

B/ Epidémiologie des tumeurs neuroendocrines

L'incidence des tumeurs neuroendocrines est d'environ 2 cas pour 100 000 habitants par an. Elle n'a cessé d'augmenter au cours du temps. Concernant les tumeurs digestives, les plus fréquentes sont les tumeurs neuroendocrines bien différenciées sécrétrices de sérotonine (75%), les insulinomes et les gastrinomes ; viennent ensuite les glucagonomes. Les VIPomes et les somatostatинomes sont très rares [4].

Les principaux sites primaires sont le système digestif (62-67%) et le poumon (20-27%). Le taux de survie à 5 ans est de 4.5% pour les tumeurs non différenciées et supérieur à 55% pour les tumeurs neuroendocrines bien différenciées. Malgré les progrès de l'imagerie qui facilitent le diagnostic, le pronostic ne s'est pas amélioré au cours du temps. La grande majorité des tumeurs neuroendocrines bien différenciées est diagnostiquée tardivement, plus de 50% étant au stade métastatique, chez un patient en bon état général. Ces tumeurs ont une évolution lente, ce qui justifie une prise en charge même à un stade avancé ainsi que l'utilisation de traitements agressifs [5].

C/ Techniques de diagnostic actuelles des tumeurs neuroendocrines

Les symptômes qui découlent des tumeurs neuroendocrines sont aussi variés que les sièges possibles de ces pathologies. Elles sont révélées par un syndrome tumoral qui peut se traduire par une occlusion de l'intestin grêle, des pneumopathies à répétition, des saignements, des douleurs abdominales, des diarrhées, une perte de poids, des vomissements, la palpation d'une masse abdominale à l'examen clinique, etc... Une tumeur neuroendocrine est dite fonctionnelle lorsqu'elle s'associe à un syndrome d'hypersécrétion hormonale, qui provoque des symptômes spécifiques à l'hormone libérée. Un résumé des symptômes associés aux tumeurs neuroendocrines fonctionnelles pancréatiques est présenté dans le tableau de la Figure 1. Les tumeurs neuroendocrines qui ne sont pas associées à un syndrome d'hypersécrétion hormonale sont dites non fonctionnelles [6, 7].

C.1. Anatomopathologie

Le diagnostic histologique repose sur des arguments histologiques, histochimiques et immuno-histochimiques. Il existe aujourd'hui une large gamme de marqueurs permettant l'identification des cellules neuroendocrines tumorales, qui peut être répartie en plusieurs groupes. Les marqueurs neuroendocrines proprement dits sont associés aux grains de sécrétion contenant les hormones endocrines, le plus utilisé étant la chromogranine A. Il est cependant parfois nécessaire d'y associer un second marqueur, commun aux cellules endocrines et aux neurones : le plus utilisé est la synaptophysine, une protéine de la membrane des vésicules synaptiques stockant les neuromédiateurs [6].

Le diagnostic anatomopathologique repose également sur la détermination du profil hormonal. Une forte proportion de tumeurs neuroendocrines est capable de synthétiser et/ou de sécréter une ou plusieurs hormones (sérotonine, calcitonine, gastrine, somatostatine, insuline...). Elles peuvent être détectées par immuno-histochimie, hybridation *in situ*, ou encore PCR pour identifier la présence d'ARN messagers. Cependant il est essentiel de corréler ces données aux données cliniques (existence d'un syndrome d'hypersécrétion hormonale) et aux résultats des dosages hormonaux dans le sang périphérique.

Le problème majeur posé par les tumeurs neuroendocrines reste celui de l'évaluation de leur profil évolutif. L'apparition récente de techniques nouvelles d'analyse moléculaire, notamment la transcriptomique ou la protéomique, laisse entrevoir la possibilité de définir de nouveaux facteurs pronostiques plus performants que ceux dont le pathologiste dispose aujourd'hui.

Name of tumor (syndrome)	Hormone causing syndrome	Signs or symptoms	Primary location	Malignant (%)
Gastrinoma (Zollinger–Ellison syndrome)	Gastrin	Abdominal pain Diarrhea Esophageal symptoms	Pancreas: 60% Duodenum: 30% Other: 10%	60–90
Insulinoma	Insulin	Hypoglycemic symptoms	Pancreas: 99%–100%	5–15
Glucagonoma	Glucagon	Rash, anemia Diabetes/glucose intolerance Weight loss Thromboembolic disease	Pancreas: 99%–100%	60
VIPoma (Verner–Morrison, pancreatic cholera, WDHA)	VIP	Severe watery diarrhea Hypokalemia	Pancreas: 90% Other: 10% (neural, adrenal, peri-ganglionic tissue)	80
Somatostatinoma	Somatostatin	Diabetes mellitus Cholelithiasis Diarrhea Steatorrhea	Pancreas: 56% Duodenum/jejunum: 44%	60
GRFoma	Growth hormone releasing factor	Acromegaly	Pancreas: 30% Lung: 54% Jejunum: 7% Other: 13% (adrenal foregut, retro-peritoneum)	30
ACTHoma (Cushing's syndrome)	ACTH	Cushing's syndrome	Pancreas: 4%–16% all ectopic Cushing's	>90
PET causing the carcinoid syndrome (carcinoid syndrome)	Serotonin tachykinins prostaglandins	Diarrhea Flushing	Pancreas: 100%	68–88
PET causing hypercalcemia	PTH-RP	Symptoms due to increased calcium	Pancreas: 100%	80–90
Nonfunctioning (PPoma, nonfunctional)	None (PP, CgA, NSE, and so forth ^a)	Weight loss, hepatomegaly Abdominal mass Occasionally asymptomatic	Pancreas: 100%	60–90

Figure 1: Tableau récapitulatif des symptômes des tumeurs neuroendocrines pancréatiques [6].

C.2. Imagerie conventionnelle

L'imagerie conventionnelle joue un rôle important dans la recherche de la tumeur primitive. Cependant, elle reste limitée dans le dépistage des tumeurs primitives de localisation digestive. Afin d'augmenter la sensibilité, des techniques d'entéroscanner se sont développées, combinant l'avantage de deux techniques connues, l'entéroclyse et la tomodensitométrie (TDM) hélicoïdale [8]. Elles permettent l'acquisition de coupes fines et multiphasiques. L'utilisation de vidéo-capsules est une autre nouvelle méthode d'imagerie non invasive permettant l'exploration du tube digestif. Ses performances ont été évaluées dans la recherche de saignements occultes. Cette technique permet une excellente visualisation de la muqueuse digestive. Elle peut cependant être prise en défaut dans les formes sous-muqueuses et ne permet pas une analyse de l'environnement péri-digestif.

Les sites métastatiques les plus courants des tumeurs neuroendocrines malignes sont les ganglions, le foie, l'os, le péritoine, le médiastin et le poumon. La recherche de métastases hépatiques, de par leur fréquence et l'importance de leur découverte dans la conduite diagnostique et thérapeutique, reste un des objectifs principaux de l'imagerie. Ces métastases sont le plus souvent multiples et hypervascularisées, et caractérisées par une prise de contraste artérielle intense. L'apport de l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) par rapport à la TDM dans la détection des métastases neuroendocrines semble réel, bien qu'il ait fait l'objet de peu d'études. En effet, l'IRM apparaît plus sensible que la TDM surtout dans les métastases hypervascularisées de petite taille grâce à son excellente résolution en contraste. Une étude a comparé les performances de la TDM et de l'IRM chez 64 patients présentant des métastases hépatiques d'origine endocrine. L'IRM a permis la détection de 394 métastases hépatiques et se révèle supérieure chez 35% des patients alors que la TDM a détecté 325 métastases et constitue le meilleur examen chez 15% des patients [9].

L'élastosonographie est une nouvelle technologie dans laquelle les contraintes des tissus sont employées pour détecter les tumeurs. Une tumeur cancéreuse est normalement 5 à 10 fois plus « rigide » que le tissu normal. Quand une compression mécanique est appliquée, la tumeur se déforme moins que le tissu environnant, c'est-à-dire que la contrainte de la tumeur est moindre. Cette propriété produit des images remarquablement claires. Par ailleurs, l'utilisation de produits de contrastes pour ultrasons (SonoVue[®]) permettrait de distinguer les adénocarcinomes (généralement hypovascularisés) des autres masses du pancréas [10].

C.3. Imagerie isotopique

La localisation exacte du site primitif et des métastases est particulièrement importante lors de la prise en charge des tumeurs neuroendocrines. Les techniques isotopiques s'appuyant sur des données fonctionnelles et moléculaires jouent un rôle déterminant et complémentaire de celui des techniques d'imagerie anatomique dites conventionnelles.

La scintigraphie repose sur l'utilisation de radio-isotopes qui permettent une imagerie avec une caméra γ . Cette technique est très sensible, puisqu'elle permet la détection de tumeurs dont la taille fait entre 5 et 10 mm [11].

C.3.1. Scintigraphie MIBG

L' ^{123}I MIBG (méta-iodobenzylguanidine) est historiquement le premier agent d'imagerie fonctionnelle des tumeurs neuroendocrines. De par son analogie structurale avec la noradrénaline, elle est capable de diffuser dans l'espace intersynaptique puis est activement recapturée par les récepteurs des terminaisons adrénergiques. Elle s'accumule sélectivement dans les organes du système sympathique sécrétant des catécholamines et les tumeurs qui en dérivent. Le traceur est éliminé par la voie métabolique hépatique et surtout par la voie urinaire. Elle reste le traceur de référence pour l'exploration des phéochromocytomes, des paragangliomes et des neuroblastomes [12]. Elle peut également être utilisée pour l'imagerie des tumeurs neuroendocrines du tube digestif et du pancréas avec une sensibilité estimée à 60-70%.

C.3.2. Scintigraphie des récepteurs de la somatostatine (SRS)

La somatostatine, hormone peptidique, exerce sur la majorité des cellules endocrines un rôle de régulation qui se traduit par l'inhibition de nombreuses fonctions digestives comme la sécrétion, la motricité et la prolifération cellulaire. Son action passe par cinq récepteurs spécifiques (sst1-5) qui appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. L'expression des récepteurs de type sst2 a été mise en évidence au niveau de la plupart de tumeurs neuroendocrines (voir section F/ Surexpression de récepteurs couplés aux protéines G dans les tumeurs : Cibles diagnostiques et thérapeutiques) [13]. Cette propriété est utilisée depuis plusieurs années pour leur diagnostic et leur traitement.

La somatostatine ayant une demi-vie très courte, des analogues de demi-vie plus longue ont été synthétisés, le plus utilisé étant le ^{111}In -DTPA-octreotide (Octreoscan[®],

Mallinckrodt Medical). Son affinité est élevée pour le sst2, relative pour le sst5, plus faible pour le sst3 et quasi nulle pour les sst1 et 4. Son élimination est principalement urinaire avec cependant un passage hépatobiliaire. Sa demi-vie effective après l'injection intra-veineuse est longue (2.8 jours), et permet l'examen du corps entier en face antérieure et postérieure grâce à l'utilisation d'une caméra γ [12].

La scintigraphie des récepteurs de la somatostatine (SRS) a considérablement amélioré le diagnostic des tumeurs neuroendocrines, qu'elles soient primitives ou secondaires. La sensibilité globale de la technique varie entre 60 et 100%. La visualisation des tumeurs en SRS dépend principalement de leur densité en récepteur sst2 et ne dépend pas du caractère sécrétant ou non de la tumeur. Elle est plus faible pour les insulinomes (60%), qui expriment peu de récepteurs de type 2. L'association de la SRS à l'échoendoscopie permet la localisation du site tumoral chez 90% des patients. De plus, la positivité de la SRS est un facteur prédictif de réponse au traitement par les analogues de la somatostatine radiomarqués [14].

C.3.3. Tomographie par émission de positrons (PET)

La tomographie par émission de positrons (PET : Positron Emission Tomographie) utilise un radionucléide isotopique (^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F) dont le noyau, en excès de protons, se désintègre vers un état stable en émettant un électron positif dit « positon » qui entre en annihilation avec un électron négatif du milieu pour émettre deux photons gamma à 180° l'un de l'autre. La détection de ces deux photons émis en coïncidence est le principe de base de la détection en PET. Son avantage majeur par rapport à la γ scintigraphie classique est un gain substantiel en pouvoir de résolution.

La PET des récepteurs à la somatostatine pourrait, à terme, remplacer la SRS qui consiste en une émission monophotonique classique. D'autres PET sont en évaluation, utilisant des peptides pour l'imagerie du RCK2 et des récepteurs de la Mélanocortine 1, de la bombésine, du GRP (gastrin release peptide), du VIP (vasoactive intestinal peptide), ou utilisant des anticorps humanisés [15, 16].

Enfin, du fait de l'élément fonctionnel qu'elle apporte, l'imagerie isotopique s'inscrit dès à présent comme un marqueur biomoléculaire pronostique et prédictif de la réponse aux thérapies novatrices telles que la radiothérapie interne vectorisée et la chimiothérapie moléculaire ciblée.

D/ Thérapies actuelles des tumeurs neuroendocrines

D.1. Chirurgie

La chirurgie est l'unique moyen de guérir les tumeurs neuroendocrines lorsqu'elles sont diagnostiquées à un stade localisé. Elle occupe également une place de plus en plus importante dans les formes métastatiques, principalement hépatiques. Les hypersécrétions éventuelles doivent être connues et contrôlées avant la chirurgie.

D.2. Traitements anti-sécrétoires médicaux

Le rôle des traitements médicaux dans la prise en charge des tumeurs neuroendocrines est double : il s'agit d'obtenir un contrôle tumoral et un contrôle des sécrétions hormonales. En cas de tumeurs sécrétantes dites fonctionnelles, le traitement médical anti-sécrétoire a d'abord pour but de diminuer les manifestations cliniques liées aux sécrétions tumorales. Les analogues de somatostatine, les inhibiteurs de la pompe à protons et, à moindre degré, l'interféron, jouent un rôle majeur dans ce domaine.

Disponible depuis une quinzaine d'années, le premier analogue de la somatostatine, l'octreotide, est administré sous forme d'injection sous-cutanée pluriquotidienne en raison d'une demi-vie courte. Il permet de réduire de 72% les symptômes liés à l'hypersécrétion. On dispose aujourd'hui d'analogues à libération prolongée tels que le lanréotide. Une étude récente ouverte multicentrique ayant évalué le lanréotide sous forme d'autogel a montré une efficacité clinique et biologique rapide après la première injection et soutenue après 6 mois [17]. Il n'existe pas à ce jour d'essai ayant comparé l'efficacité et la tolérance du lanréotide et de l'octreotide. D'autres analogues de la somatostatine, comme par exemple le SOM 230, sont actuellement évalués en essai clinique de phase II chez des malades résistants aux analogues standards. Ces nouveaux analogues semblent avoir une forte affinité pour les récepteurs sst1, 2, 3 et 5 mais pas pour le récepteur sst4 [18].

Cependant, les effets anti-prolifératifs des analogues de somatostatine restent controversés. C'est pourquoi une étude clinique randomisée de phase IIIb a été menée en double aveugle en Allemagne en 2010. Quatre vingt cinq patients atteints de tumeurs neuroendocrines bien différenciées de l'intestin moyen ont été traités soit avec l'octréotide soit avec un placebo (NaCl). La médiane de survie par rapport à la progression tumorale était de 14.3 mois dans le groupe traité avec l'octréotide contre 6 mois dans le groupe contrôle.

Après 6 mois de traitement, les taux de progression tumorale étaient de 23.8% pour l'octréotide contre 53.5% pour le placebo et les taux de stabilisation de 66.6% contre 37.2% respectivement [19]. Néanmoins, les traitements anti-sécrétoires sont essentiellement des traitements symptomatiques dont l'effet anti-tumoral reste modeste. En cas de métastases non résecables, il faut alors se tourner vers des traitements tels que la chimiothérapie.

D.3. Chimiothérapie

En général, les tumeurs neuroendocrines ne sont pas très sensibles à la chimiothérapie, et si elles répondent, les améliorations sont lentes à apparaître. Cela peut être dû à leur faible index mitotique, car un grand nombre de molécules cytotoxiques ciblent principalement les cellules présentant fort taux de prolifération. De plus, les tumeurs neuroendocrines expriment fortement les gènes de résistance aux médicaments MDR-1 (multidrug resistance). Ces gènes codent pour des protéines d'efflux, telles que la glycoprotéine P (Pgp), qui sont capables d'excréter un grand nombre de molécules anti-cancéreuses. La forte expression du gène anti-apoptotique bcl-2 peut également contribuer à la résistance intrinsèque aux agents chimiothérapeutiques [1].

Dans le cas de tumeurs neuroendocrines métastatiques peu différenciées, le traitement est identique quel que soit le siège. Il fait appel à la chimiothérapie systémique, associant l'etoposide au cisplatine. Le taux de réponse objective est de 40 à 60%, dont 25% de réponse complète, avec un bénéfice sur la survie [20].

En cas de tumeurs bien différenciées et métastatiques évolutives, le traitement est adapté en fonction du siège de la tumeur. L'association de streptozotocine et d'adriamycine est considérée comme la chimiothérapie de référence des tumeurs neuroendocrines pancréatiques [21]. Cependant le rapport efficacité/toxicité n'est pas très favorable et de nouvelles approches thérapeutiques sont souhaitables. Dans le cas de tumeurs neuroendocrines extra-pancréatiques, la chimiothérapie de référence associe la streptozotocine et le fluorouracile. Le taux de réponse est de 30% [22].

D.4. Radiothérapie métabolique

La radiothérapie métabolique ou « radiothérapie interne » est une modalité de traitement fondée sur la fixation sélective d'une molécule radiomarquée par des cibles tumorales dans le but de délivrer localement une dose de radiation à visée thérapeutique. Le

ciblage des récepteurs à la somatostatine exprimés dans les tumeurs neuroendocrines, initialement utilisé dans une stratégie diagnostique, a conduit au développement d'applications thérapeutiques. L'utilisation des analogues de la somatostatine radiomarqués pour le traitement des tumeurs neuroendocrines bien différenciées inopérables ou métastatiques est ainsi en plein essor depuis 10 ans (voir section F.2.1. Récepteur de la somatostatine (sst2)).

L'Indium 111 (^{111}In) est un radioélément bien adapté aux applications diagnostiques mais inadapté aux applications thérapeutiques. C'est pourquoi il a d'abord été remplacé par l'Yttrium 90 (^{90}Y) [23], puis par le Lutétium 177 (^{177}Lu), qui sont des radioéléments émetteurs de particules β . Le chélateur DTPA (di-éthylène-tri-amino penta-acétique) n'étant pas suffisamment stable, il a été modifié en DOTA (acide tétra-aza-cyclododécane-tétra-acétique). Une étude menée sur 131 patients traités par le [^{177}Lu -DOTA⁰,Tyr³]octréotate a montré une rémission totale chez 2% des patients et des rémissions partielles et mineures dans 26% et 19% des cas respectivement. La stabilisation de la progression de la tumeur gastro-entéro-pancréatique a été observée chez 35% des patients [24].

L'étude des mécanismes de toxicité rénale a permis de montrer que les analogues de somatostatine radiomarqués sont filtrés dans les glomérules et partiellement réabsorbés par les cellules tubulaires proximales via un récepteur, la mégaline, pour ensuite subir une dégradation lysosomiale. Le peptide lui-même est dégradé dans les lysosomes alors que le complexe chélateur-radionucléide s'accumule dans les cellules tubulaires proximales où l'énergie dispersée localement est toxique sur la cellule rénale. La mégaline est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs des lipoprotéines de faible densité. Elle est exprimée de façon très abondante dans les tubules proximaux des reins. Chargée négativement, elle fixe de façon préférentielle les molécules chargées positivement, dont l'octréotide, pour permettre leur endocytose. L'administration concomitante d'acides aminés basiques (lysine et arginine) permet de diminuer la captation rénale et donc de limiter la toxicité rénale du traitement [25].

Les limites de la radiothérapie métabolique concernent l'hétérogénéité des fixations tumorales qui peut être due à une expression insuffisante du récepteur ciblé ou à une accessibilité limitée du récepteur, elle-même liée à une mauvaise vascularisation ou à des remaniements nécrotiques.

La section suivante aborde plus en détail la biologie des principales tumeurs qui surexpriment les RCPG. Cette liste n'est pas exhaustive, et se focalise en particulier sur les

tumeurs neuroendocrines et les GIST qui surexpriment le RCK2. L'objectif de cette partie est de décrire l'origine de ces tumeurs, ainsi que d'approfondir les thérapies actuelles et leurs limites.

E/ Exemples de tumeurs neuroendocrines : Biologie, diagnostic et thérapie

E.1. Carcinome Médullaire de la Thyroïde (MTC)

Les carcinomes médullaires de la thyroïde (MTC : Medullary Thyroid Carcinoma) sont des tumeurs neuroendocrines qui dérivent des cellules parafolliculaires, ou cellules C, sécrétrices de calcitonine. Bien qu'ils ne représentent que 5 à 10% des cancers de la thyroïde, les MTC sont responsables de 13% des décès associés aux cancers de cette glande endocrine [1].

Dans 25% des cas les MTC sont associés au syndrome héréditaire autosomique dominant MEN, incluant les sous-types MEN 2A, MEN 2B et FMTC (familial MTC). Ces syndromes résultent de mutations germinales du proto-oncogène RET, localisé sur le chromosome 10q11.2. Ce gène code pour un récepteur tyrosine kinase transmembranaire qui est impliqué dans la prolifération, la différenciation et la mobilité cellulaire. Les mutations associées aux syndromes MEN 2A et FMTC sont situées dans le domaine extracellulaire riche en cystéine, ce qui entraîne une activation constitutive du récepteur suite à sa dimérisation indépendante du ligand [26]. Les mutations du syndrome MEN 2B affectent la partie catalytique du domaine tyrosine kinase intracellulaire et sont responsables de l'activation constitutive de voies de signalisation, entraînant l'expression de plusieurs gènes cibles impliqués dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Figure 2) [27]. Les formes les plus agressives ont été observées chez les patients atteints du syndrome MEN 2B, chez lesquels les MTC sont diagnostiqués dans la petite enfance, à un stade métastatique.

La majorité des cas de MTC sont d'origine sporadique (75%). Des mutations du proto-oncogène RET ont été identifiées dans 40 à 50% des cas. Cependant, la présence de ces mutations dans la tumeur primaire et les métastases n'est pas systématique, suggérant qu'elles ne sont pas à l'origine de la carcinogenèse mais qu'elles apparaissent pendant la progression tumorale, à laquelle elles participent [28]. En plus de RET, le récepteur au VEGF et le proto-oncogène MET pourraient être impliqués dans la pathologie [29].

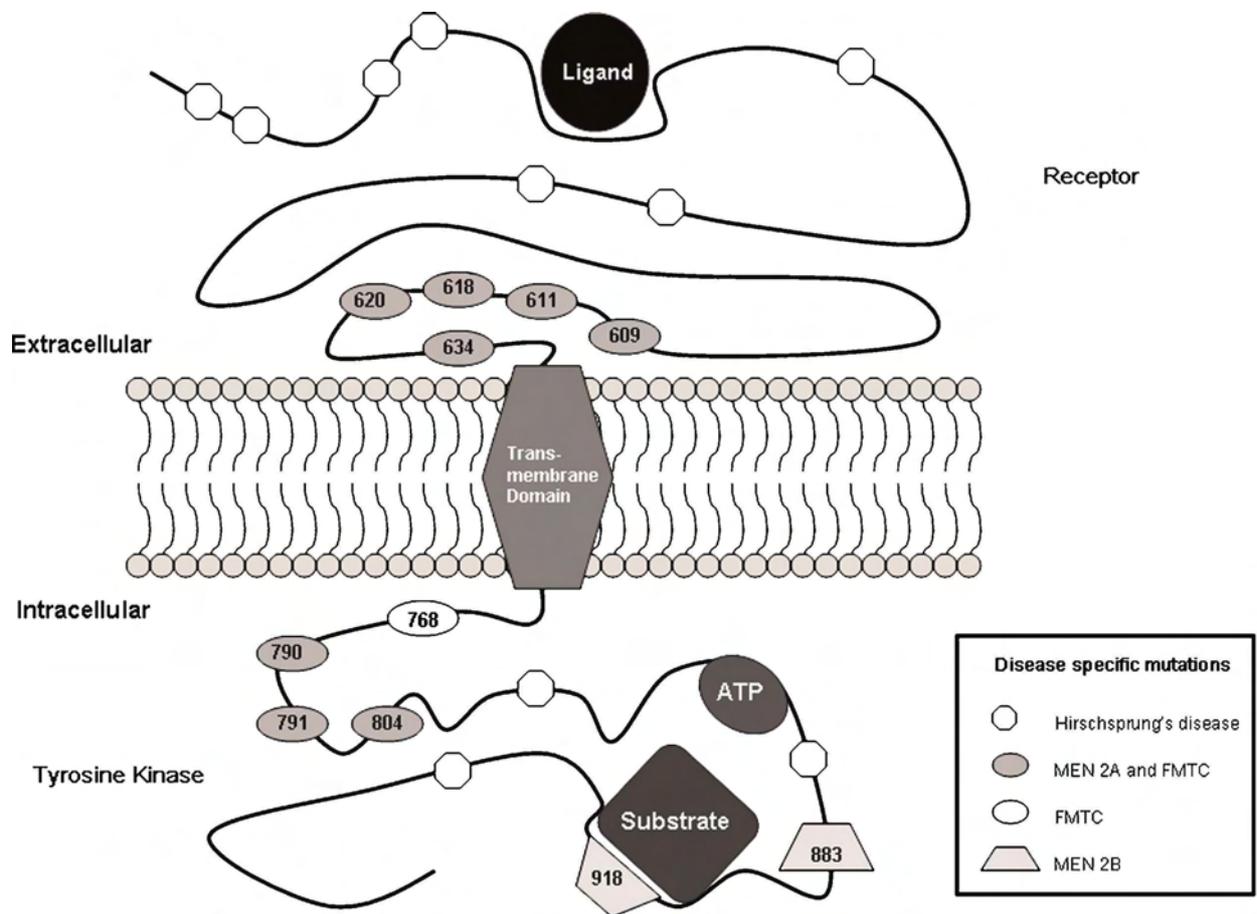


Figure 2: Représentation schématique des mutations associées aux différentes formes de MTC [27].

La chirurgie est l'unique traitement efficace pour les MTC primaires. Cependant, au moment du diagnostic environ 50% des patients présentent des métastases distantes (dans les poumons, le foie, les os et parfois dans le cerveau). Les techniques d'imagerie ne permettent pas la localisation de ces métastases, bien que leur présence soit signalée par le niveau élevé de calcitonine dans le sérum [30]. Les autres options thérapeutiques sont relativement inefficaces, avec notamment une réponse aux chimiothérapies conventionnelles inférieure à 25%, ainsi que des résultats décevants avec l'Octreoscan[®]. De nouvelles stratégies sont actuellement en développement, reposant notamment sur l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des voies de signalisation des kinases. La plupart ont la propriété d'inhiber les récepteurs au VEGF, et donc de cibler initialement l'angiogenèse. De plus, étant donné les similarités structurelles entre les kinases VEGFR et RET, la plupart de ces inhibiteurs sont capables d'agir sur les 2 kinases. Par exemple, l'utilisation du sunitinib (voir section Tumeurs stromales gastro-intestinales GIST) dans un essai clinique de phase II a permis d'obtenir une réponse chez 43% des patients et une stabilisation de la maladie dans 83% des cas [29].

E.2. Insulinomes

Bien que son incidence soit de 1 à 4 cas par million d'habitants chaque année, l'insulinome est la tumeur neuroendocrine fonctionnelle la plus fréquente du pancréas (70-80%). La tumeur est le plus souvent unique et bénigne, mais peut devenir maligne dans 10% des cas. A part quelques cas associés au syndrome MEN 1, la majorité des insulinomes sont sporadiques. Ils proviennent des cellules β des îlots de Langerhans. Ce sont des tumeurs hypervascularisées de petite taille (< 2 cm) qui sont caractérisées par une sécrétion d'insuline incontrôlée, même en situation d'hypoglycémie. Le diagnostic est donc basé sur une augmentation anormale de la concentration plasmatique d'insuline et de peptide C (pro-insuline). Le proto-oncogène c-myc est soupçonné d'être impliqué dans l'initiation et la progression tumorale des cellules β [31].

Dans l'immense majorité des cas, le traitement est l'exérèse chirurgicale. Lorsque l'insulinome n'a pas été localisé ou dans le cas de métastases inextirpables, des traitements médicaux symptomatiques sont mis en place, tel que le diazoxide, qui inhibe la sécrétion des granules d'insuline. Les analogues de somatostatine peuvent également être utilisés pour réduire la sécrétion d'insuline et la survenue d'hypoglycémie chez les patients ne supportant pas le diazoxide. Cependant, la réponse à ce traitement est faible car seul 46% des insulinomes expriment le récepteur sst2 [32].

La différence entre un insulinome bénin et malin est difficile à établir, et le diagnostic repose sur des preuves intra-opératoires (métastases dans le foie et dans les ganglions régionaux, invasion locale) [33]. Dans le cas de métastases, une chimiothérapie à base de streptozotocine peut être administrée. Il s'agit d'un agent alkylant naturel de la classe des nitrosourées présentant suffisamment de similarités avec le glucose pour être reconnu par le transporteur GLUT2. Il cible donc spécifiquement les cellules β productrices d'insuline car il n'est pas reconnu par les autres transporteurs [32].

E.3. Cancers du poumon à petites cellules (SCLC)

Les cancers du poumon à petites cellules (SCLC : Small Cell Lung Cancer) représentent 15 à 20% des cancers du poumon, et sont invariablement associés à l'exposition au tabac. La tomographie par ordinateur (TDM) thoracique est l'examen de choix dans la recherche d'une tumeur neuroendocrine pulmonaire.

Les SCLC sont très agressifs, avec des métastases dans 60 à 70 % des cas au moment du diagnostic. Cette forme de cancer est initialement très sensible à la chimiothérapie, avec une réponse chez 60 à 80% des patients. La chimiothérapie de première ligne repose soit sur la combinaison du cyclophosphamide, de la doxorubicine et de la vincristine (CAV), soit sur la combinaison de l'etoposide et du cisplatine (EP). Malgré ce fort taux de réponse, la médiane de survie est de 12 à 20 mois, avec seulement 6 à 12% des patients qui vivent au-delà de 5 ans. Ce mauvais pronostic, qui est encore pire lorsque les patients sont diagnostiqués à un stade métastatique, est lié aux récurrences qui apparaissent dans la majorité des cas [34].

Actuellement, le traitement de deuxième ligne est le topotecan, un inhibiteur de la topoisomérase I. Un essai clinique de phase III a montré que le topotecan permettait un taux de réponse supérieur à la combinaison CAV (24.3% et 17.3% respectivement), ainsi qu'une augmentation du taux de survie (25.9 versus 13.9 semaines) [34]. Récemment, le picoplatine a également été testé en essai clinique de phase III chez des patients présentant une rechute. Ce composé fait partie de la famille des sels de platine, qui ont la propriété de créer des pontages sur l'ADN, ce qui induit l'apoptose. Cet essai n'a pas permis de montrer d'amélioration significative par rapport au topotecan [35]. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

De multiples aberrations chromosomiques ont été identifiées dans les SCLC, reflétant l'instabilité du génome. Dans la majorité des cas, on trouve des délétions affectant plusieurs sites chromosomiques, avec des pertes récurrentes au niveau des loci 3p, 5q, 13q et 17p, sur

lesquels sont localisés des gènes suppresseurs de tumeurs tel que p53. D'autres analyses ont montré des gains de fonctions affectant les loci d'oncogènes (Myc et Kras). La perte d'un allèle du chromosome 3p apparaît avec une fréquence supérieure à 90% des SCLC, et est supposée être un évènement précoce dans la carcinogenèse des tumeurs du poumon. D'autre part, la protéine FUS1 (FUUsed in Sarcoma 1) est perdue dans 100% des SCLC. Cette protéine est impliquée dans l'arrêt en phase G1 et l'apoptose [36]. Un essai clinique de phase I utilisant des nanoparticules en tant que vecteur pour la délivrance de FUS1 est actuellement en cours pour le traitement des cancers du poumon non à petites cellules [37]. Il s'agit de combiner un vecteur plasmidique contenant le gène codant pour la protéine FUS1 complexé avec un lipoplexe : ce sont des complexes de transfection composés de cholestérol et d'un lipide cationique, le DOTAP (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-NNN-tri-méthyl-ammonium-méthyl sulfate) [38].

E.4. Tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST)

Les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST : GastroIntestinal Stromal Tumor) sont les sarcomes les plus fréquents du tube digestif. Leur incidence est de 1.5 pour 100 000 personnes par an. Les GIST se développent principalement à partir des cellules interstitielles de Cajal, une population cellulaire du tube digestif possédant une activité pacemaker de la motricité digestive. L'estomac est le site primaire le plus fréquent (65% des cas). Les autres sites primaires sont l'intestin grêle (25%) et, plus rarement, le colon, l'œsophage, le rectum et le péritoine. Les métastases sont principalement retrouvées dans la cavité intra-péritonéale et dans le foie [39].

Les GIST sont caractérisées dans 80 à 90% des cas par des mutations activatrices dans les gènes KIT ou PDGFR α qui codent pour deux récepteurs membranaires de la famille des tyrosines kinases. Ces mutations aboutissent à une activation constitutive des voies de signalisation du récepteur, notamment RAS/RAF/ERK, JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR et la voie SRC kinase et jouent un rôle essentiel dans l'induction du processus tumoral [39].

La grande majorité des mutations concerne le gène KIT, impliqué dans environ 85% des GIST. Une mutation au niveau du gène PDGFR α est retrouvée dans 8% des cas. Les autres cas concernent des GIST sans mutation détectable des gènes KIT les plus fréquemment recherchés (exons 9, 11, 13 et 17) ou PDGFR α (exon 12, 14 et 18) : on les appelle alors les GIST WT pour « wild type » (Figure 3, d'après le Dr Axel Le Cesne, disponible sur ce site : http://www.ensemblecontrelegist.com/affiche_actu.php?id_actu=116).

Caracteristiques “génotypiques” des GISTs	
<i>KIT</i>	Environ 75 à 80% des mutations
Exon 11	Mutation la plus fréquente (environ 2/3), la mutation la plus sensible à l’imatinib
Exon 9	2^{ème} mutation la plus fréquente (10 à 15 %) mutation moins sensible à l’imatinib
Exons 13 & 17	Mutations rares (~2%)
<i>PDGFRA</i>	Environ 5 à 10% des mutations
Exons 12 & 14	Mutations rares (< 2%)
Exon 18	La plus fréquente des mutation (6%), La mutation D842V est résistante à l’imatinib
“Wild-type”	Pas de mutation <i>KIT/PGFR</i> (environ 10%); Expression de IGF1R?

Figure 3: Mutations les plus fréquentes dans les GIST.

Les chimiothérapies conventionnelles sont peu efficaces dans les GIST, avec des taux de réponse rapportés inférieur à 10%. Aujourd'hui le traitement de première intention des GIST localement avancées inopérables ou métastatiques est l'imatinib mésylate, qui est un inhibiteur sélectif des récepteurs tyrosines kinases KIT et PDGFR α . L'imatinib est un inhibiteur compétitif de la liaison de l'ATP qui bloque l'activité enzymatique de la kinase. Malgré une sensibilité initiale importante de l'imatinib dans les GIST avancées, 20% des patients développent des résistances secondaires après un temps médian de 24 mois, dues en grande partie à l'acquisition de nouvelles mutations au niveau du récepteur [40]. Le sunitinib a démontré une activité importante chez ces patients en situation de résistance secondaire ou d'intolérance à l'imatinib [41]. Outre son efficacité remarquable en terme de contrôle tumoral et de survie sur l'ensemble des patients résistants à l'imatinib, il a été rapidement admis que le bénéfice du sunitinib était significativement supérieur dans les GIST présentant une mutation initiale sur l'exon 9 de KIT ou ne présentant pas de mutation (WT). De plus, il est actif contre un spectre plus large de protéines kinases que l'imatinib : en plus de KIT et de PDGFR α , il inhibe les récepteurs VEGFR et RET. Cependant des phénomènes de résistance au sunitinib sont également apparus [40].

Bien que des thérapies existent pour les tumeurs neuroendocrines, elles sont souvent inefficaces, généralement à cause de l'apparition de phénomènes de résistance. De nouvelles approches thérapeutiques sont donc nécessaires. C'est pourquoi, depuis une vingtaine d'années, la surexpression de plusieurs types de récepteurs a été exploitée afin de développer une approche thérapeutique basée sur l'utilisation de ligands radiomarqués ciblant les RCPG.

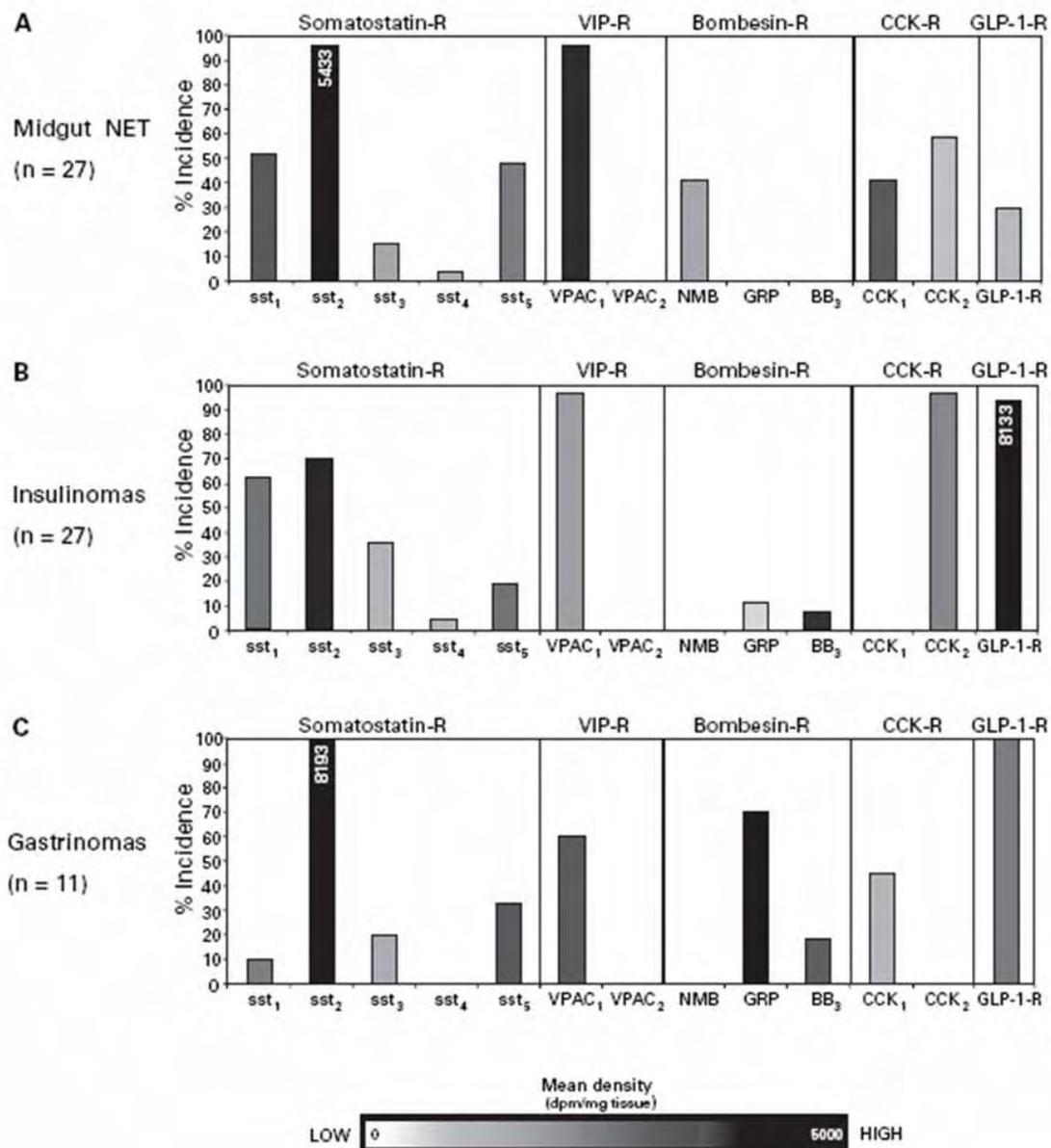


Figure 4: Incidence et densité de 13 RCPG testés dans les tumeurs neuroendocrines.

La densité moyenne des récepteurs dans les tumeurs neuroendocrines de l'intestin moyen (A), dans les insulinomes (B) et dans les gastrinomes (C) est représentée par la gamme de gris (0 à 5000 dpm/mg de tissu). Les valeurs supérieures à 5000 dpm/mg de tissu sont représentées par un histogramme noir, dans lequel la valeur de la densité a été insérée [42].

F/ Surexpression de récepteurs couplés aux protéines G dans les tumeurs : Cibles diagnostiques et thérapeutiques

Cette partie aborde uniquement le cas des tumeurs neuroendocrines et des tumeurs stromales gastrointestinales (GIST).

F.1. Récepteurs couplés aux protéines G surexprimés dans les tumeurs neuroendocrines et les GIST

Les tumeurs neuroendocrines sont caractérisées par la surexpression d'un certain nombre de RCPG (Figure 4). L'exemple le plus significatif est celui des récepteurs de la somatostatine (sst). Ces récepteurs ont été identifiés par des expériences d'autoradiographie dans les adénomes de l'hypophyse sécrétant d'hormones de croissance, les tumeurs gastro-entéro-pancréatiques, les phéochromocytomes, les neuroblastomes, les paragangliomes, les carcinoïdes bronchiques et dans une moindre mesure dans les carcinomes médullaires de la thyroïde et les cancers du poumon à petites cellules. Parmi les tumeurs neuroendocrines gastro-entéro-pancréatiques, les gastrinomes, les glucagonomes, les vipomes et les tumeurs de l'intestin expriment les récepteurs de la somatostatine dans 80 à 100% des cas, alors que l'incidence n'est que de 50 à 70% pour les insulinomes. En général, les récepteurs de la somatostatine sont exprimés de manière homogène dans ces tumeurs. Le sous-type de récepteur prédominant dans ces tumeurs est le sst2, suivi du sst1 et sst5, alors que le sst3 est moins fréquent et le sst4 pratiquement absent [11, 42-46]. Par contre, les récepteurs de la somatostatine sont généralement absents dans les GIST (tumeurs stromales gastrointestinales) [47]. D'autre part, l'expression de ces récepteurs dépend également du stade de différenciation des tumeurs neuroendocrines. En effet, les tumeurs bien différenciées expriment habituellement ce récepteur, contrairement aux tumeurs non-différenciées [13].

Comme cela sera évoqué en détail dans le chapitre suivant (voir section Chapitre II : D.3. Surexpression du récepteur CCK2 dans les tissus tumoraux), le récepteur CCK2 est exprimé en forte densité dans plusieurs types de tumeurs neuroendocrines, avec une forte incidence dans les carcinomes médullaires de la thyroïde (92%), les astrocytomes (65%), les cancers ovariens du stroma (100%), les insulinomes (97%) et les cancers du poumon à petites

cellules (57%) [48]. La densité d'expression du RCCK2 dans les GIST est supérieure à celle des carcinomes médullaires de la thyroïde (MTC). Elle est également supérieure à l'expression physiologique de ce récepteur dans l'estomac [47].

L'expression du récepteur CCK1 dans les tumeurs est beaucoup moins importante que celle du RCCK2. Il a été détecté dans les méningiomes (30%), certains neuroblastomes (19%), et dans les tumeurs gastro-entéro-pancréatiques (dans 50% des gastrinomes et des carcinoïdes de l'iléon) [48, 49].

Le récepteur de la bombésine et du GRP (gastrin-releasing peptide) est essentiellement exprimé dans les GIST (84%) en très forte densité [47]. Il a également été détecté dans les gastrinomes, les carcinoïdes de l'iléon, les cancers du poumon à petites cellules et les carcinoïdes bronchiques [11, 50, 51].

Les récepteurs VPAC1 et 2 transmettent les effets de deux neurotransmetteurs de l'intestin, le VIP (vasoactive intestinal peptide) et le PACAP (pituitary adenylate cyclase activating peptide). Les carcinoïdes bronchiques, les insulinomes, les carcinoïdes de l'iléon et une proportion importante de gastrinomes expriment de façon importante le sous-type VPAC1, mais pas le sous-type 2 [50]. Le sous-type 1 est également retrouvé dans les tumeurs gliales, les neuroblastomes, les adénomes de l'hypophyse, les phéochromocytomes et les paragangliomes [46]. Par contre, le récepteur VPAC2 est exprimé en forte densité dans la majorité des GIST [47].

Le récepteur GLP-1 (glucagon-like peptide 1) est impliqué dans la sécrétion d'insuline et est exprimé dans les cellules β des îlots de Langerhans. Des études ont montré que ce récepteur est exprimé dans la quasi-totalité des insulinomes, avec une très forte densité. Il est également exprimé de façon abondante dans les phéochromocytomes, et dans les tumeurs cérébrales et embryonnaires. De plus, sa présence a été détectée dans la quasi-totalité des gastrinomes [50, 52].

Récemment, nous avons mis en évidence l'expression d'un autre membre de la famille des récepteurs à effet incrétine, le récepteur GIP (glucose-dependent insulinotropic peptide). Ce récepteur a été découvert dans la quasi-totalité des tumeurs neuroendocrines pancréatiques, iléales et bronchiques, avec une incidence et une densité supérieure à celle du récepteur sst2. De plus, il est exprimé dans les insulinomes malins qui sont négatifs pour le récepteur GLP-1 [53]. Ces résultats sont détaillés dans l'article II de la partie Résultats.

L'expression concomitante de plusieurs types de récepteurs dans un même type de tumeurs offre la possibilité attrayante de réaliser un ciblage plurivalent, grâce à l'injection

simultanée de plusieurs radio-ligands. En particulier, les récepteurs GIP et CCK2 constituent des cibles efficaces pour le diagnostic et la thérapie des insulinomes, et la combinaison des ligands des récepteurs GRP et GLP-1 offrirait un ciblage optimal des gastrinomes.

D'autre part, la surexpression de multiples récepteurs dans les tumeurs neuroendocrines gastro-entéro-pancréatiques peut avoir une pertinence pathologique. En effet, la plupart des peptides impliqués, c'est-à-dire le GRP, la CCK, la gastrine, le VIP et la somatostatine sont connus pour leurs effets stimulants ou inhibiteurs sur la croissance cellulaire. Ils pourraient donc jouer un rôle dans la croissance tumorale. Malheureusement, l'implication de ces RCPG dans l'oncogenèse des tumeurs neuroendocrines n'est encore très bien caractérisée.

F.2. Développement de radio-ligands pour cibler les cancers surexprimant les récepteurs couplés aux protéines G

Le ciblage des récepteurs surexprimés dans les tumeurs malignes permet l'imagerie et la thérapie hautement spécifique de ces tumeurs, grâce à l'utilisation d'analogues radiomarqués de peptides hormonaux. Pour cela, la densité de récepteurs dans la tumeur doit être suffisamment importante, le récepteur doit lier le ligand avec une forte affinité, et il doit s'internaliser [11].

F.2.1. Récepteur de la somatostatine (sst2)

Plusieurs groupes ont montré que les cancers présentant une forte densité de récepteur de la somatostatine, en particulier le sous-type sst2, étaient de bons candidats pour la radiothérapie ciblée. En effet, la densité des récepteurs à la somatostatine dans les tumeurs est largement supérieure à celle des tissus non tumoraux. De plus, les récepteurs sst2 s'internalisent après la liaison de leur ligand. En conséquence, la radioactivité délivrée par le vecteur est retenue par la cellule cible [48].

La scintigraphie des récepteurs à la somatostatine (SRS) a débuté dans les années 1980, avec le développement de l'¹¹¹In-DTPA-octreotide. De nos jours, des analogues de somatostatine marqués avec des émetteurs de positrons sont disponibles. L'utilisation de ces composés combinée avec des techniques de tomographie par émission de positrons et de tomodensitométrie fournit de très bonnes données physiologiques et anatomiques. Les

analogues de somatostatine produisent un ratio signal tumoral/bruit de fond favorable, ce qui permet le traitement des patients atteints de tumeurs neuroendocrines métastatiques [54].

Afin d'optimiser la détection et la thérapie des tumeurs neuroendocrines, de nouveaux radio-ligands sont en cours de développement, avec pour stratégie de cibler plusieurs sous-types de récepteur sst, car une même tumeur peut exprimer plusieurs sous-types [45].

La Scintigraphie du Récepteur de la Somatostatine (SRS) est actuellement la procédure standard pour la détection des tumeurs neuroendocrines et de leurs métastases. Néanmoins, pour certains types de tumeurs la sensibilité de la SRS est limitée car la densité de récepteur sst2 est insuffisante. C'est pourquoi d'autres récepteurs sont actuellement à l'étude pour le développement de nouveaux radio-ligands.

F.2.2. Autres exemples de récepteurs

La localisation des insulinomes par la SRS pose problème, à cause de la faible expression du récepteur sst2 dans ces lésions. Plusieurs insulinomes négatifs pour ce récepteur ont en revanche montré une forte densité d'expression du récepteur GLP-1. Cette caractéristique a conduit au développement d'un analogue radiomarqué de ligand du récepteur GLP-1. Son injection chez des patients a permis la localisation d'insulinomes pour lesquels les techniques d'imagerie traditionnelle n'avaient pas donné de résultats satisfaisants [55].

Les récepteurs à la bombésine et au GRP (gastrin-releasing peptide) ont été ciblés dans des études cliniques pour la scintigraphie de carcinomes du sein et de la prostate, car leur densité y est bien supérieure à celle du récepteur sst2 [11].

D'autre part, les récepteurs VPAC sont exprimés en forte densité dans la plupart des cancers épithéliaux. Cependant, leur utilisation en scintigraphie est limitée car ils sont présents dans un trop grand nombre de tissus normaux [11].

La surexpression de plusieurs types de récepteurs dans certains cancers pourrait constituer la base pour la radiothérapie multi-récepteurs. L'injection de plusieurs radio-ligands présenterait deux avantages : premièrement, cela augmenterait considérablement la dose thérapeutique délivrée à la tumeur ; et deuxièmement, cette approche permettrait de s'affranchir du problème de l'hétérogénéité d'expression des récepteurs dans les tumeurs [45].

F.2.3. Développement d'antagonistes radiomarqués

Alors que les agonistes s'internalisent massivement dans les cellules tumorales, permettant l'accumulation active de la radioactivité, cette propriété n'est pas retrouvée pour les antagonistes. C'est pourquoi, pendant de nombreuses années, les antagonistes n'ont pas été envisagés dans la stratégie de ciblage des récepteurs pour la radiothérapie anti-cancéreuse.

Néanmoins, l'injection d'antagonistes spécifiques du récepteur sst2 ou sst3 chez des souris a conduit à une accumulation dans les tissus cibles nettement supérieure à celle obtenue pour l'ensemble des agonistes du récepteur de la somatostatine actuellement disponibles. Cette étude a montré qu'ils étaient capables de marquer plus de sites que les agonistes [56]. Cela est probablement dû à la capacité des antagonistes à se lier aux récepteurs quelle que soit leur conformation, c'est-à-dire indépendamment de leur couplage avec les protéines G [57]. Ces résultats ont récemment été confirmés dans une étude pré-clinique réalisée chez 5 patients atteints de MTC. En effet, l'antagoniste du récepteur sst2 a permis de détecter 25 lésions sur 28, contre seulement 17 pour l'agoniste. De plus, chez un même patient, la rétention tumorale de l'antagoniste radiomarqué est supérieure à celle de l'agoniste (3.5% contre 1% de la dose injectée), alors qu'il présente une rétention rénale plus faible (1.5% contre 2.3% respectivement) [58].

De plus, les antagonistes sont des composés chimiques plus stables et hydrophobes que les agonistes. L'utilisation d'antagonistes du récepteur de la somatostatine serait donc préférable à celle des radio-ligands agonistes. Il convient maintenant d'évaluer si cette stratégie peut s'appliquer à d'autres récepteurs. En effet, l'étude pré-clinique citée ci-dessus n'a pas permis de détecter 100% des lésions, c'est pourquoi il est important de cibler d'autres récepteur, tel que le RCK2, dont l'incidence est supérieure à celle du sst2 pour certaines tumeurs neuroendocrines.

F.2.4. Récepteur CCK2

Dans le cas des insulinomes et des MTC, la SRS n'a permis de détecter que 40% des lésions, alors que la scintigraphie du RCK2 a permis de détecter 94% de ces tumeurs [59]. Cette dernière apporte également une amélioration de la détection des tumeurs neuroendocrines gastro-entéro-pancréatiques [60]. Le récepteur CCK2 apparaît donc comme un bon candidat pour la scintigraphie. Cette partie est développée en détail dans le chapitre suivant dans la section Chapitre II : D.4. Développement de radio-ligands pour la scintigraphie du récepteur CCK2.

Chapitre II : Le Récepteur CCK2

A/ Les ligands du Récepteur CCK2

A.1. Les ligands naturels : la Cholecystokinine (CCK) et la Gastrine

A.1.1. Structure et maturation

La Gastrine a été isolée en 1964 par Gregory et Tracy à partir de la muqueuse antrale de porc [61]. Cette hormone est synthétisée sous la forme d'un précurseur, la préprogastrine, qui comporte 101 acides aminés. La maturation de ce précurseur se fait par des clivages en progastrine puis en gastrine, avec une sulfatation de la tyrosine en position 6 à partir de l'extrémité C-terminale, et une α -amidation carboxyterminale. Ces maturations post-traductionnelles vont donner naissance à des polypeptides de différentes longueurs. La maturation de la préprogastrine aboutit à l'obtention de deux peptides de gastrine bioactifs de 34 et 17 acides aminés, dont la moitié est sulfatée (Figure 5a) [62, 63]. Il est à noter que les précurseurs de la gastrine, la pro-gastrine (Pro-G) et la forme non amidée de la gastrine, la gastrine glycine étendue (G-Gly) possèdent la capacité d'induire l'activation de voies de signalisation par l'intermédiaire d'un récepteur non identifié mais pharmacologiquement distinct de celui de la gastrine mature (Figure 5b) [64-66].

La CCK a été isolée pour la première fois en 1968 sous la forme d'un peptide de 33 acides aminés [67]. Son séquençage révéla qu'elle était structurellement proche de la gastrine, puisqu'elle partage avec cette dernière les 5 acides aminés de l'extrémité C-terminale: Gly-Trp-Met-Asp-Phe-CO-NH₂. Ce pentapeptide représente la structure minimale nécessaire à l'activité biologique des deux hormones, cependant la présence des huit derniers acides aminés de la CCK s'avère essentielle pour son activité biologique complète [62, 63].

La forme non maturée de la CCK est la préproCCK composée de 115 acides aminés. La préproCCK subit plusieurs clivages protéiques et la sulfatation de la tyrosine en position 7 à partir de l'extrémité C-terminale. Plusieurs formes de CCK résultant de la maturation post-traductionnelle sont physiologiquement présentes dans le sang : la CCK-58, CCK-33, CCK-22 et la CCK-8 (Figure 5a) [62, 63, 68].

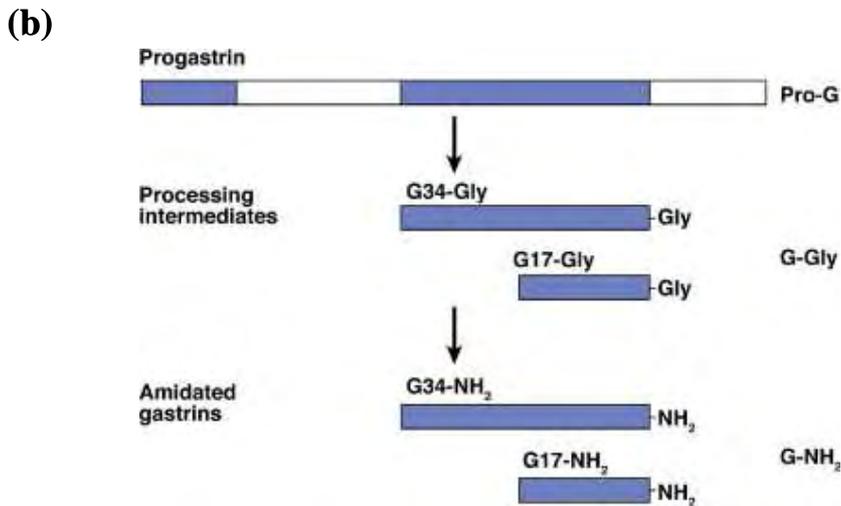
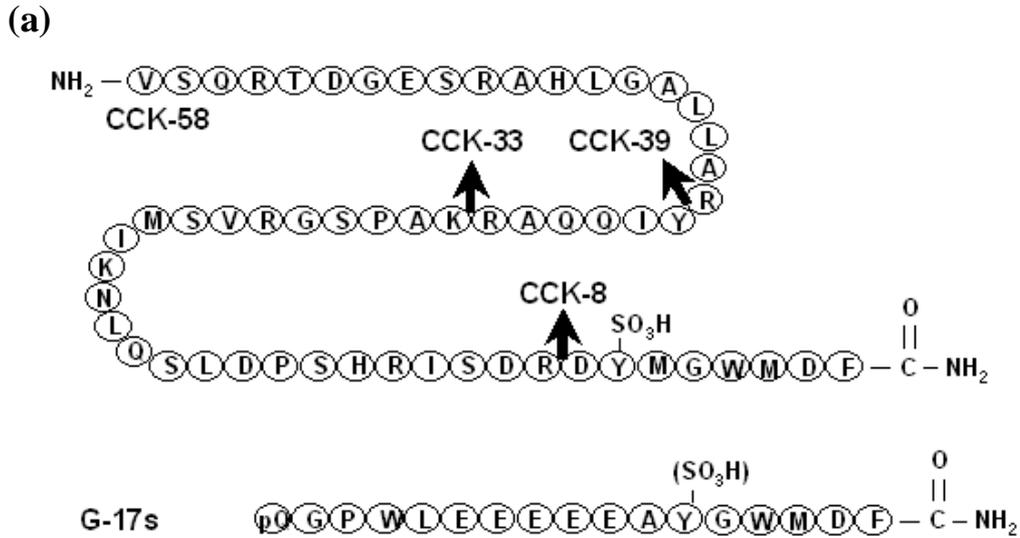


Figure 5: Séquence de la Cholécystokinine (CCK) et de la gastrine.

- a) Ces deux hormones présentent plusieurs formes de différentes longueurs. Elles sont caractérisées par une sulfatation de la totalité des molécules de CCK et de la moitié des molécules de gastrine, ainsi que par l'amidation de l'extrémité carboxy-terminale.
- b) Maturation de la gastrine à partir de ses précurseurs la Pro-gastrine (Pro-G) et la gastrine glycine-étendue (G-Gly) [65].

A.1.2. Cellules endocrines sécrétant la Gastrine et la CCK

Chez l'homme, l'expression du gène de la gastrine est localisée au niveau des cellules G de la muqueuse de l'antrum pylorique et du duodénum. La gastrine est libérée en réponse au contact du bol alimentaire avec les parois de l'antrum gastrique, et plus particulièrement avec la membrane baso-latérale des cellules G. Sa sécrétion est stoppée par l'élévation de la concentration d'acide gastrique [62, 69].

La sécrétion de la CCK est localisée au niveau de la muqueuse duodénale. Celle-ci est très plissée, et comporte des villosités recouvertes d'entérocytes dont le pôle apical hérissé de microvillosités leur donne l'aspect d'une bordure en brosse. Entre les grandes villosités s'ouvrent des cryptes, dont la paroi est constituée entre autres des cellules I sécrétant la CCK. L'arrivée du chyme dans cette partie de l'intestin, particulièrement si celui-ci contient des acides aminés ou des acides gras, déclenche la libération de CCK. La concentration basale de CCK circulante est de l'ordre de 1 à 2 pM, alors qu'en période post-prandiale elle s'élève à environ 5 pM [70]. Cette hormone est également synthétisée dans certaines cellules corticotrophes et mélanotrophes de la glande pituitaire, et dans les cellules médullaires surrénales.

Il existe en outre des neurones à CCK au niveau du tractus gastro-intestinal qui innervent en particulier le côlon et le pancréas. Par ailleurs, la CCK est le neuropeptide le plus abondant du système nerveux central, en particulier dans les aires corticales et dans les neurones dopaminergiques mésencéphaliques [63].

A.2. Les ligands synthétiques

Les fonctions physiologiques et pathologiques associées aux récepteurs de la gastrine et de la CCK (RCCK1 et RCCK2) ont suscité un intérêt pour le développement de ligands spécifiques à visées thérapeutiques. Un important répertoire de molécules structurellement diverses et sélectives du récepteur CCK2 a été généré. Ce panel d'agonistes et d'antagonistes a contribué à la caractérisation des sous-types de récepteur RCCK, les récepteurs RCCK1 et RCCK2, ainsi qu'à une meilleure compréhension du rôle de chacun dans les différents tissus.

Cette diversité de ligands inclut des dérivés peptidiques de la gastrine et de la CCK, ainsi que des petites molécules conçues pour mimer les caractéristiques structurales essentielles des hormones endogènes : les peptoïdes. Des ligands synthétiques additionnels

ont été identifiés par criblage à haut débit de bibliothèques de composés non-peptidiques, et ont subi une étape d'optimisation du composé chimique aboutissant à l'accroissement de l'affinité et de la spécificité pour le RCCK2. Ces ligands couvrent une large gamme d'activités fonctionnelles, allant de l'agoniste plein ou partiel, à l'agoniste inverse [71]. Les antagonistes du RCCK2 ont été étudiés en vue d'une utilisation dans le contrôle de l'anxiété et de la sécrétion acide gastrique, ainsi que pour le traitement de la tolérance aux drogues [72].

B/ Le Récepteur CCK2, un membre de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

Les récepteurs de la CCK ont été découverts pour la première fois en 1978, par des expériences de liaison d'un analogue de la CCK, la caeruleine radio-marquée sur des cellules acineuses pancréatiques de rat [73]. Un second type de récepteur avec un profil pharmacologique différent est ensuite découvert dans le cerveau de rat. L'affinité de la gastrine pour le récepteur exprimé dans le cerveau est de l'ordre du nanomolaire, alors qu'elle est 500 à 2000 fois plus faible dans le pancréas de rat [74]. Le premier récepteur a été nommé RCCK-A pour Alimentary, et le second RCCK-B pour Brain, mais selon les recommandations du comité de l'Union Internationale de Pharmacologie (IUPHAR), le RCCK-A a été renommé RCCK1, et le RCCK-B, RCCK2 [75].

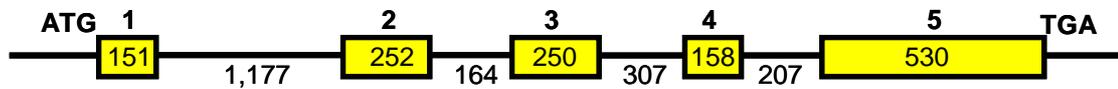
Le RCCK1 et le RCCK2 diffèrent par leurs affinités relatives pour les ligands naturels ainsi que par leurs distributions tissulaires. En effet, le RCCK1 lie la CCK sulfatée avec une affinité 500 à 1000 fois supérieure que celle de la gastrine, sulfatée ou non, et son expression est majoritairement localisée en périphérie [76]. A l'inverse, le RCCK2 lie la CCK ou la gastrine avec des affinités similaires [77].

B.1. Clonage et structure

Le récepteur de la gastrine fut identifié pour la première fois dans des cellules pariétales canines [78]. A l'époque, le récepteur de la CCK localisé dans le cerveau est considéré comme différent de celui de la gastrine, et ce n'est qu'après leurs clonages que les chercheurs réalisent qu'il s'agit d'un même et unique récepteur, le RCCK2 [79]. La séquence code pour une protéine de 453 acides aminés, présentant une homologie de 48% avec le

(a)

Chromosome 11, p15.4



(b)

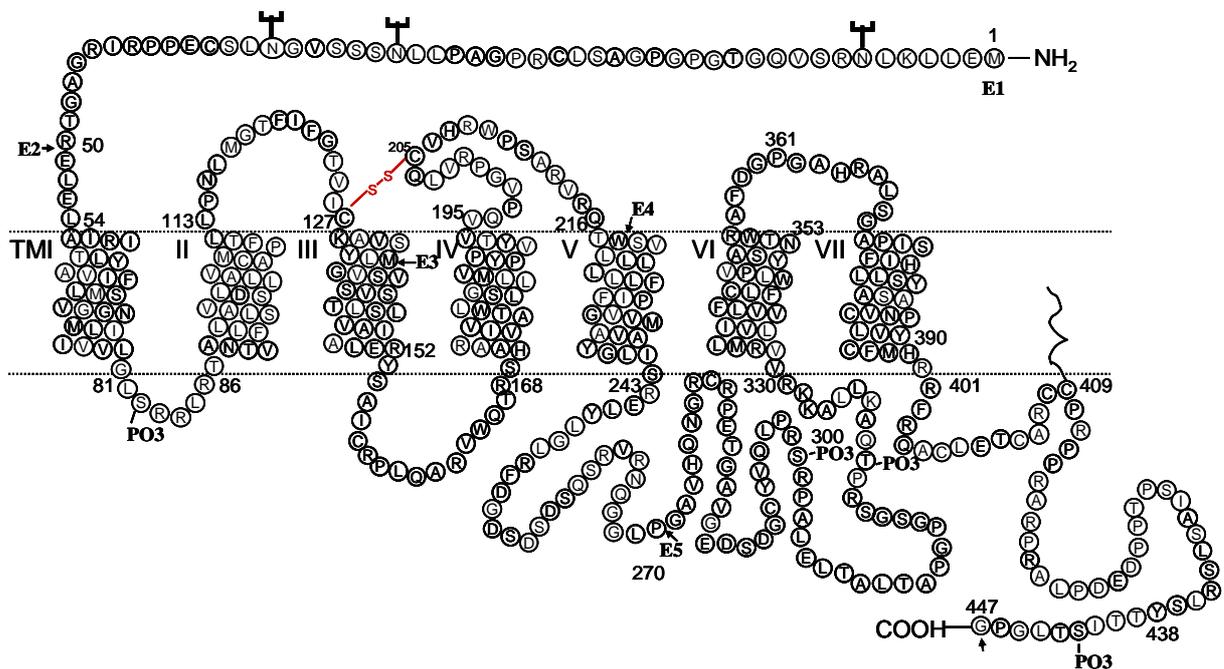


Figure 6: Représentation schématique du gène et de la protéine du récepteur CCK2 humain.

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

RCKK1. Par ailleurs, cet ADN complémentaire (ADNc) code pour une protéine qui contient sept segments hydrophobes, correspondant aux caractéristiques des récepteurs à 7 domaines transmembranaires [80]. L'ADNc du RCKK2 humain est cloné l'année suivante par criblage d'une banque d'ADNc de cerveau, l'ADNc canin servant de sonde. Il s'agit d'une protéine de 447 acides aminés, d'une masse moléculaire de 48 kDa [81]. Chez l'homme, le gène codant pour le RCKK2 est localisé sur le chromosome 11, au niveau du locus p15,4. Il est composé de cinq exons et de quatre introns (Figure 6a) [82].

Le récepteur CCK2 présente les caractéristiques structurales des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) de la famille A. En effet, au niveau extracellulaire il possède une extrémité N-terminale courte ainsi que deux cystéines engagées dans un pont disulfure sur les deux premières boucles extracellulaires [83]. De plus, trois sites consensus de N-glycosylation sont présents sur cette région [84, 85]. La partie C-terminale se situe en intracellulaire et possède une cystéine palmitoylée qui permet la formation d'une quatrième boucle intracellulaire, du fait de l'ancrage membranaire de la partie C-terminale (Figure 6b) [75, 86].

B.2. Transduction du signal

L'activation des protéines G hétérotrimériques est une caractéristique commune aux RCPG, et du RCKK2 en particulier. Son occupation par un agoniste conduit à l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaires, impliquées dans des processus physiologiques variés (Figure 7).

La liaison de la gastrine ou de la CCK sur le RCKK2 va principalement entraîner l'activation de la phospholipase C (PLC) par l'intermédiaire des protéines G de type $G\alpha_q$. La phospholipase C hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-biphosphates (PIP₂) en inositol triphosphates (IP₃) et en diacylglycérol (DAG). Les isoformes de la PLC activées par le RCKK2 sont essentiellement la PLC β et la PLC γ 1 [87, 88]. Les IP₃ sont des messagers secondaires qui stimulent la libération de calcium dans le cytosol, en agissant sur les récepteurs aux IP₃ de la membrane du réticulum endoplasmique. Le DAG quant à lui, va activer différentes protéines kinase C (PKC). Les PKC participent à la modulation de la voie des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) [68].

Les MAPKinases sont des sérines/thréonines kinases qui regroupent les *Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2* (ERK1/2), c-jun N-terminal kinases (JNK), ERK5, et

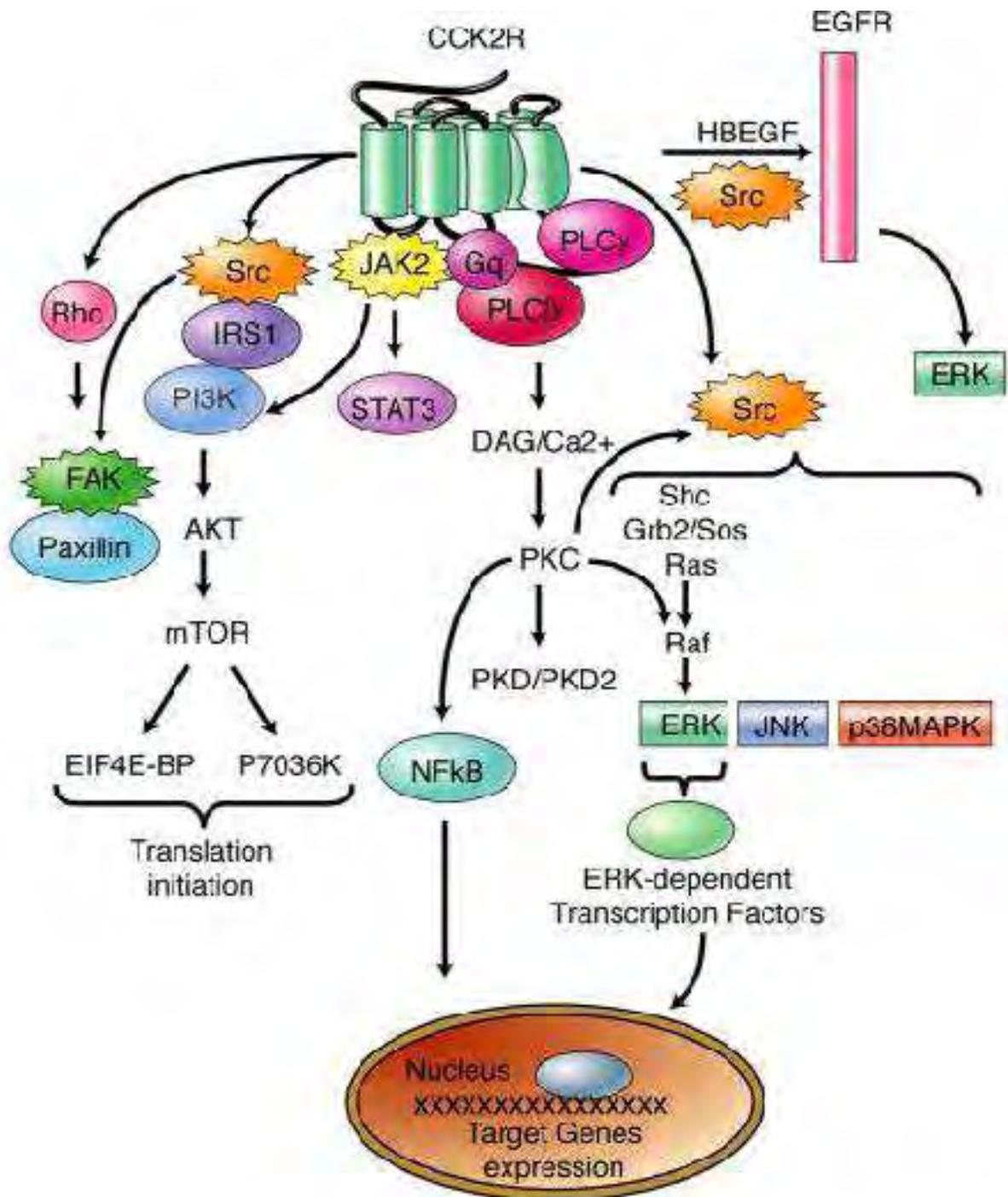


Figure 7: Représentation schématique de la signalisation du RCCK2.

Le récepteur CCK2 stimulé active un grand nombre d'effecteurs cellulaires appartenant à différentes voies de signalisation comme la voie PLC, MAPKinases ou encore PI3-kinases [68].

p38MAPK. La cascade de phosphorylation Ras/Raf/ERK-kinases/ERK1/2 conduit à la régulation de la prolifération, la différenciation, la survie ou l'apoptose cellulaire. Ces mécanismes sont modulés par les kinases qui activent des facteurs de transcription par phosphorylation. Le complexe Grb2/Sos ou Shc/Grb2/Sos stimule cette cascade aboutissant à la phosphorylation des ERK1/2, après l'activation de Src et Shc par la gastrine via le RCCK2 [89, 90].

Dans les cellules épithéliales gastrointestinales, la transactivation du récepteur de l'EGF (epidermal growth factor) peut être à l'origine de l'activation des ERK1/2. En effet, l'expression et la maturation du précurseur proHB-EGF dans ces cellules en réponse à la gastrine entraînent la libération de HB-EGF. Ce peptide libéré par voie auto- et paracrine induit la phosphorylation de son récepteur (EGFR) et donc l'activation des voies en aval, dont celle des ERK1/2. Par ailleurs, le RCCK2 peut trans-activer l'EGFR via une voie de signalisation impliquant la famille des Src kinases [91, 92].

Une autre MAPKinase, la p38MAPK, est activée par le RCCK2 via un mécanisme impliquant la PKC, le calcium intracellulaire et Src, et joue un rôle central dans la prolifération induite par le RCCK2 [93].

L'activation du RCCK2 conduit à la phosphorylation par Src d'une protéine adaptatrice IRS-1. Cette protéine IRS-1 via ses acides aminés tyrosines phosphorylés recrute et active la PI3-kinase (Phosphatidylinositol 3-kinase) [90]. L'activation de la PI3-kinase aboutit à la synthèse de seconds messagers lipidiques, les phosphoinositides, qui correspondent à la forme phosphorylée des phosphatidylinositols. Ces seconds messagers se lient aux domaines PH de protéines cytosoliques comme Akt et permettent ainsi leur ancrage membranaire. La voie PI3-kinase/Akt a des effets prolifératifs et anti-apoptotiques et joue un rôle dans la régulation de l'adhésion et de la migration cellulaire [68, 94, 95].

Au sein de notre équipe, des travaux ont permis de définir une nouvelle voie de signalisation du RCCK2 : JAK2/STAT3 [96, 97]. Les protéines JAK (Janus Kinase) sont des tyrosines kinases dont les principaux substrats sont les facteurs de transcription de la famille STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription). Les protéines JAK sont recrutées aux RCPG et s'activent par autophosphorylation. Les STAT sont phosphorylées par JAK, puis se dimérisent avant d'être transloquées dans le noyau où elles jouent leur rôle de facteur de transcription. Cette voie de signalisation est impliquée dans la prolifération cellulaire induite par la gastrine.

La stimulation du RCCK2 active et module d'autres effecteurs qui ne seront pas détaillés ici mais parmi lesquels on peut citer l'intégrine $\beta 1$ ou encore le facteur NF κ B/I κ B. La modulation de ces différents effecteurs est développée dans la revue de Dufresne et collègues [68].

B.3. Internalisation du récepteur CCK2

Les récepteurs couplés aux protéines G sont, pour la plupart, rapidement internalisés après stimulation par leur ligand. L'une des voies majeures de l'internalisation des protéines membranaires est la voie dite dépendante de la clathrine. Elle fait intervenir une structure spécialisée de la membrane appelée « puits recouverts de clathrine ». Ces structures sont enveloppées d'un manteau protéique constitué par le complexe AP-2 et la clathrine, dont la polymérisation est sous le contrôle d'AP-2. Ces puits recouverts de clathrine vont s'invaginer vers l'intérieur de la cellule, puis une petite GTPase, la dynamine, va assurer la scission entre la vésicule d'endocytose et la membrane plasmique. La vésicule d'endocytose ainsi formée contient toujours les récepteurs insérés dans la membrane [98].

Il existe seulement deux études qui décrivent les mécanismes impliqués dans l'internalisation du RCCK2, dont l'une réalisée récemment par notre équipe. Le RCCK2 s'internalise rapidement et de façon abondante suite à sa stimulation par la gastrine ou la CCK (92% des récepteurs) [99]. Ces résultats ont été confirmés par notre équipe. De plus le ligand semble rester lié au récepteur lors de l'internalisation dans la cellule. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques nous a permis d'affirmer que l'internalisation du RCCK2 était un phénomène dépendant de la clathrine et de la dynamine [100].

B.3.1. Implication de l'extrémité C-terminale et rôle des β -arrestines

La désensibilisation d'un récepteur après sa stimulation implique notamment la phosphorylation par les GRK (G protein-coupled receptor kinase) de résidus sérines et thréonines situés dans les domaines intracellulaires et l'extrémité C-terminale du récepteur. Cette phosphorylation permet la liaison des β -arrestines au récepteur, ce qui entraîne le découplage de la protéine G par gêne stérique. Il en résulte la désensibilisation de la réponse

intracellulaire. Puis les β -arrestines engagent le récepteur dans le processus d'endocytose grâce au recrutement d'un ensemble de partenaires, dont la clathrine et l'adaptateur AP-2 (Figure 8) [98, 101].

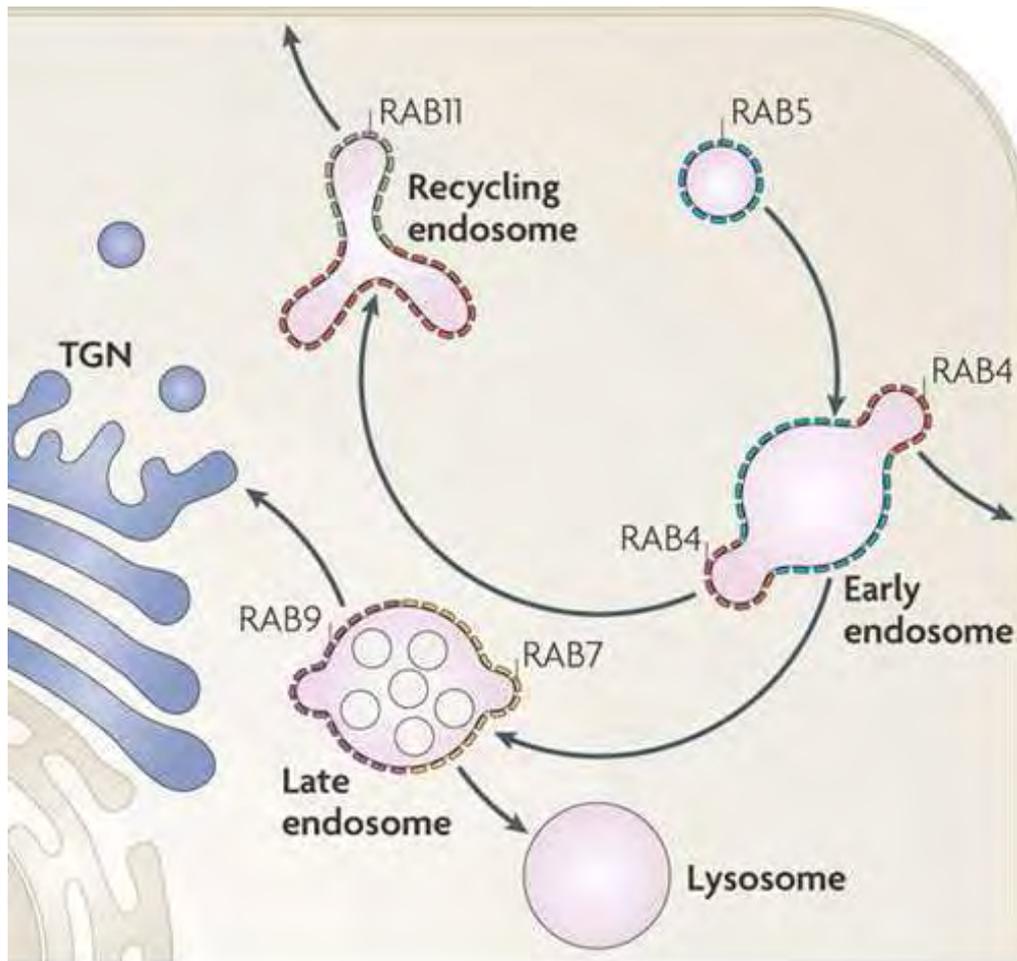
L'extrémité C-terminale joue un rôle important dans l'internalisation du RCCK2 puisque le taux des récepteurs internalisés diminue fortement lorsque celui-ci est tronqué (26%). D'autre part, l'absence de phosphorylation des sérines-thréonines provoque également une baisse du taux de RCCK2 internalisés (39%), ce qui suggère une implication des β -arrestines [99]. En effet, des études de B.R.E.T ont permis à notre équipe de montrer une interaction directe entre les β -arrestines 1 et 2 et le RCCK2. De plus, la surexpression de dominants négatifs des β -arrestines inhibe l'entrée du ligand fluorescent dans la cellule [100].

Cependant, l'internalisation du récepteur CCK2 dans des cellules MEF invalidées pour les deux sous-types de β -arrestines est rapide et abondante [100]. Ces résultats suggèrent qu'un mécanisme alternatif se met en place lors de l'absence des β -arrestines. Un tel mécanisme pourrait requérir une interaction directe entre le récepteur et un adaptateur comme AP2 ou encore faire intervenir une voie d'internalisation indépendante de la clathrine comme les cavéolines.

B.3.2. Devenir du récepteur dans la cellule

Les RCPG internalisés rejoignent rapidement des structures vésiculaires diverses qui constituent un véritable réseau au sein de la cellule. Ce réseau vésiculaire assure différentes fonctions cellulaires telles que l'endocytose, le recyclage de protéines membranaires, la dégradation protéique, ou l'exocytose. Les RCPG internalisés sont immédiatement acheminés vers une structure vésiculaire appelée endosomes précoces où s'effectue le tri entre les RCPG destinés au recyclage et ceux destinés à la dégradation. Les RCPG s'engagent plutôt dans des voies de recyclage rapide (quelques minutes) pour les récepteurs de classe A (tels que le récepteur β 2-adrénergique ou angiotensine II 1A) [102], et dans des voies de recyclage lent (plusieurs heures) et de dégradation pour les récepteurs de classe B.

Notre étude sur les mécanismes d'internalisation du RCCK2 a montré que le récepteur n'était pas recyclé rapidement à la membrane plasmique. Le trafic vésiculaire emprunté par le RCCK2 lors de son internalisation a été déterminé grâce à l'étude de sa co-localisation avec différentes protéines GTPases Rab, qui régulent le trafic intracellulaire des RCPG (Figure 9)



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 9: Les principales GTPases Rab impliquées dans la régulation du trafic des RCPG.

Les endosomes précoces contiennent des domaines enrichis en Rab5 (bleu) et Rab4 (rouge), qui sont impliqués dans la fusion des endosomes et le recyclage endocytaire respectivement. Les endosomes de recyclage rapide sont enrichis en Rab4 alors que les endosomes de recyclage lent sont enrichis en Rab11 (vert). Les endosomes tardifs contiennent des domaines enrichis en Rab7 (jaune) et Rab9 (violet) qui régulent le trafic vers les lysosomes et l'appareil de golgi respectivement [103].

[103, 104]. Nos résultats montrent que le RCCK2 utilise une voie faisant intervenir des vésicules d'endocytose précoce exprimant Rab5 au début de l'internalisation du récepteur. Puis environ deux heures après la stimulation, le RCCK2 est localisé dans des vésicules de recyclage lent, exprimant Rab11. La co-localisation du récepteur avec Rab11 s'étend jusqu'à six heures après la stimulation. A partir de cinq à six heures, on détecte également une co-localisation du récepteur avec les protéines Rab7 indiquant qu'une partie des récepteurs est dirigée vers les lysosomes. L'ensemble des résultats obtenus nous permet de classer le récepteur CCK2 dans la Classe B des RCPG selon les critères d'internalisation [100].

B.4. Dimérisation du récepteur CCK2

Un seul article fait état de la dimérisation du récepteur CCK2. Le récepteur pourrait s'homodimériser et aussi s'hétérodimériser avec le récepteur CCK1. Cette étude utilise une approche de mesure de distance relative entre les deux récepteurs au moyen de la technique de B.R.E.T dans un système transfecté de manière transitoire. Il est rapporté que le dimère RCCK1-RCCK2 provoque une activation augmentée des voies de signalisation ainsi qu'une internalisation retardée. Une conséquence de cette potentialisation de l'activation du RCCK2 est l'effet prolifératif significativement augmenté par la co-expression des récepteurs CCK1 et CCK2 [105].

C/ Distribution tissulaire et effets physiologiques du récepteur CCK2

C.1. Distribution tissulaire

C.1.1. Expression au niveau du système digestif

Le RCCK2 est exprimé dans l'estomac, où il joue un rôle important dans la sécrétion d'acide gastrique, la prolifération, la différenciation et la maturation des glandes gastriques. Des études réalisées chez l'homme et le chien ont montré qu'il était majoritairement présent dans la muqueuse fundique, notamment dans les cellules pariétales [106, 107] et les cellules ECL [108]. Le RCCK2 a également été détecté sur quelques cellules endocrines non identifiées, qui sont négatives pour la gastrine, l'histamine, la sécrétine, la somatostatine, l'enképhaline et le peptide libérant de la gastrine (gastrin-releasing peptide) [109].

La présence de l'ARN messenger (ARNm) du RCCK2 a été rapportée dans les cellules acinaires du pancréas humain. Bien que le faible niveau de transcripts du RCCK2 n'ait pas pu être détecté par des expériences d'hybridation *in situ* [110], il a été rapporté que des acini isolés à partir de pancréas humain répondaient à la stimulation par la CCK [111]. De plus, la présence du récepteur a été identifiée par autoradiographie dans les acini de patients atteints de pancréatite chronique, ce qui indique que les acini humains ont la capacité d'exprimer le RCCK2 [50]. Par contre, la question d'une participation éventuelle du RCCK2 dans les fonctions du pancréas exocrine reste posée.

Les cellules à glucagon ont été décrites par notre équipe comme étant le site majeur de la localisation du RCCK2 dans le pancréas endocrine [77]. D'autres études réalisées chez plusieurs espèces mammifères situent le RCCK2 sur les cellules à somatostatine [112]. Cependant les résultats sont très discordants d'une étude à l'autre.

La majorité des articles suggèrent que le colon normal n'exprime pas le RCCK2, à l'exception d'une détection par RT-PCR dans le colon de souris [113].

Au niveau des autres organes périphériques, le RCCK2 a également été détecté dans les glandes surrénales [114] et les reins [115].

C.1.2. Expression au niveau du système nerveux central

Le RCCK2 représente l'essentiel des sites de liaison de la CCK dans le système nerveux central. Ce neuropeptide, abondamment produit par les neurones, constitue le ligand endogène prédominant du RCCK2 dans le cerveau [62, 75]. Des études de liaison par autoradiographie ont montré une forte densité de RCCK2 au niveau du cortex, des bulbes olfactifs et du noyau accumbens. Ces résultats ont été confirmés par la détection de l'ARNm dans les tissus correspondant [75, 116, 117].

C.2. Effets physiologiques de la gastrine et de la CCK médiés par le récepteur CCK2

C.2.1. Rôle physiologique de la CCK

C.2.1.1. Au niveau du système digestif

Au niveau du système digestif, où les récepteurs sont exposés à la fois à la CCK et à la gastrine, on estime que le ligand endogène prédominant est la gastrine, en raison de sa concentration plasmatique environ 5 à 10 fois plus élevée que celle de la CCK. Il est admis que l'essentiel des effets de la CCK sont transduits par le RCCK1, à l'exception des situations où ce peptide est libéré par des terminaisons nerveuses situées au voisinage de cellules exprimant le RCCK2 [62].

C.2.1.2. Au niveau du système nerveux central

Le cerveau présente un grand nombre de neurones à CCK, particulièrement au niveau des aires corticales. Le noyau accumbens, impliqué dans la schizophrénie et les crises de panique, est principalement innervé par des neurones dopaminergiques co-libérant de la CCK. L'administration de CCK provoque des attaques de panique chez des volontaires sains, et augmente les désordres comportementaux chez des patients présentant déjà ces troubles [63, 75]. De plus, les concentrations de CCK sont diminuées dans le cortex cérébral des personnes atteintes de schizophrénie, principalement dans les lobes frontaux et temporaux ; ainsi, il a été suggéré que la schizophrénie pourrait être associée à une activité réduite de la CCK [75, 118].

D'autre part la CCK est un peptide de la satiété qui agit sur les centres cérébraux de la faim et favorise l'arrêt de la prise alimentaire chez différentes espèces de mammifères incluant l'homme [75, 118]. Cette fonction est principalement transduite par le RCCK1, cependant une étude menée dans notre équipe basée sur un modèle de souris KO pour le RCCK2, développant une obésité modérée, suggère que le RCCK2 pourrait aussi moduler la prise alimentaire [119].

La CCK est également impliquée dans la régulation du système opioïde, en induisant la libération d'opioïdes endogènes. Son implication dans la nociception présente donc un intérêt dans le traitement de la douleur [75].

C.2.2. Rôle physiologique de la Gastrine

C.2.2.1. Rôle dans la digestion

La gastrine stimule la sécrétion d'acide chlorhydrique par les cellules pariétales de la paroi de l'estomac. La gastrine se lie au récepteur CCK2 des cellules entérochromaffin-like (ECL) pour déclencher la libération d'histamine. Une fois libérée l'histamine stimule de manière paracrine les cellules pariétales qui sécrètent l'acide chlorhydrique. La gastrine active aussi directement les cellules pariétales via le RCCK2. Lorsque le suc gastrique atteint un taux d'acidité suffisamment élevé (pH autour de 2), la sécrétion de gastrine est inhibée par la somatostatine. On peut noter que la sécrétion de gastrine est également stimulée par l'action de la caféine, légèrement par l'alcool, et par les protéines absorbées. Le tonus du sphincter oesophagien inférieur est augmenté sous l'effet de la gastrine [62].

C.2.2.2. Action trophique

La première observation de l'action trophique de la gastrine a été faite chez des patients atteints de gastrinome, ceux-ci présentant une hypertrophie de la muqueuse gastrique. La gastrine stimule la prolifération et la différenciation des cellules de la muqueuse gastrique. Des souris invalidées pour la gastrine ou son récepteur CCK2 présentent une muqueuse gastrique atrophiée et une carence en cellules pariétales et ECL. L'absence de gastrine perturbe la sécrétion acide basale, insensibilise celle-ci à une stimulation ponctuelle par l'histamine ou la gastrine, réduit le nombre de cellules pariétales et perturbe la migration des cellules ECL le long des glandes gastriques [120, 121].

Au niveau du pancréas, l'expression de la gastrine et de son récepteur est cantonnée au tissu endocrine, où la gastrine régulerait la sécrétion du glucagon [77]. La gastrine contribuerait également au développement pancréatique, à la prolifération et la différenciation des îlots de Langerhans lors de la régénération tissulaire [68].

D/ Le récepteur CCK2 dans les cancers

D.1. Implication tumorale dans les cancers digestifs

Un nombre croissant d'éléments suggère que la gastrine et la CCK agissent en tant que facteurs de croissance et d'invasion via l'activation de leurs récepteurs, favorisant ainsi le développement et la progression de cancers.

D.1.1. Cancers gastriques

Une infection par la bactérie *Helicobacter pylori* est le principal facteur de risque environnemental contribuant au développement d'un cancer gastrique. Cette infection est accompagnée d'une augmentation de la sécrétion plasmatique de gastrine par les cellules G [122]. L'hypersécrétion de gastrine entraîne la prolifération des cellules ECL, ce qui initie et maintient des modifications néoplasiques dans ces cellules. D'autres phénomènes peuvent être à l'origine de l'hypergastrinémie, tels qu'une gastrite atrophique, une anémie pernicieuse, une forte inhibition des sécrétions acide de l'estomac liée à l'administration d'inhibiteurs de pompes à protons, ou la sécrétion de gastrine par une tumeur neuroendocrine (gastrinome ou syndrome de Zollinger-Ellison) [88, 123]. La co-expression du RCCK2 et de la gastrine, détectée dans environ 50% des patients atteints d'adénocarcinomes gastriques, est corrélée avec une aggravation du pronostic, suggérant que la gastrine agirait selon une boucle autocrine dans un sous-groupe de carcinomes gastriques [124].

D.1.2. Cancers pancréatiques

L'adénocarcinome pancréatique est un cancer de très mauvais pronostic, du fait d'un diagnostic souvent tardif. Notre laboratoire a développé un modèle de souris transgéniques *ElasCCK2* qui exprime le RCCK2 humain dans les acini pancréatiques, et qui présente des perturbations de l'homéostasie tissulaire aboutissant au développement d'un cancer du pancréas chez environ 15% de ces animaux. Le RCCK2 pourrait donc jouer un rôle clé dans l'initiation des cancers pancréatiques [125, 126]. De plus, une étude menée chez l'homme a montré l'expression du récepteur CCK2 chez la plupart des patients atteints d'un cancer pancréatique, associée à l'expression de la gastrine, suggérant à nouveau l'existence potentielle d'une boucle autocrine *in vivo* [127]. Cependant, il est possible que la détection du RCCK2 dans les carcinomes pancréatiques chez l'homme provienne d'une contamination résiduelle par les tissus sains, et ne corresponde pas à une expression dans les tissus néoplasiques [50].

D.1.3. Cancers colorectaux

Dans le cas des cancers coliques, les précurseurs de la gastrine, la pro-gastrine (Pro-G) et la gastrine glycine étendue (G-Gly), représentent 90 à 100% des formes de gastrine sécrétées par les tumeurs, et sont retrouvées dans plus de 80% des polypes colorectaux

humains [128]. L'action proliférative et invasive de ces précurseurs, montré chez plusieurs modèles cellulaires et animaux, a longtemps été décrite comme étant indépendante de la présence du RCCK2 [64, 65, 129-131]. Cependant, l'existence d'un récepteur propre à ces précurseurs a été remise en cause par une étude récente, qui montre que la délétion ou l'inactivation du RCCK2 dans un modèle murin est responsable de la réversion du phénotype induit par la surexpression de pro-gastrine [132].

D'autre part, de nombreuses études ont montré l'implication du RCCK2 et de son ligand gastrine dans les processus de carcinogenèse du colon sur des lignées cellulaires et des modèles animaux transgéniques [133-136]. Une seule étude contredit ces données, en montrant que la gastrine exerce un effet anti-prolifératif et pro-apoptotique sur des cellules de cancer du colon humain [137].

En revanche, l'expression du RCCK2 dans les tissus tumoraux humains est plus controversée. En effet, bien que l'ARNm du RCCK2 ait été détecté chez 30 patients sur 79 cas [138], la protéine n'a été détectée chez aucun des 102 patients inclus dans une autre étude [139].

Plusieurs modèles cellulaires et animaux ont permis de montrer l'implication du RCCK2 dans les processus de carcinogenèse. Cependant, la détection du RCCK2 dans les tissus humains de cancers du pancréas et du colon est plus problématique. Les divergences des résultats pourraient s'expliquer par une contamination des extraits de tissus tumoraux par les tissus sains environnant la tumeur, ou par la différence de sensibilité des techniques employées.

D.2. Variants du récepteur CCK2 identifiés dans les cancers digestifs

Chez l'homme, le gène codant pour le RCCK2 est localisé sur le chromosome 11, au niveau du locus p15,4. Il est composé de cinq exons et quatre introns. En 1995, un variant d'épissage présentant une extrémité N-terminale tronquée a été isolé à partir d'ARN d'estomac humain. Ce récepteur résulterait de l'emploi d'un nouvel exon, appelé 1b, localisé sur l'intron 1. Il est capable de lier la gastrine et la CCK, avec cependant une perte d'affinité d'un facteur 10. Chez l'homme, les transcripts du variant et de la forme longue du RCCK2 sont tous les deux exprimés dans l'estomac, alors que seul le variant est retrouvé dans la lignée cellulaire d'adénocarcinome gastrique humain AGS [140].

Un autre variant d'épissage, décrit comme possédant une activité constitutive, a été découvert par l'équipe d'Hellmich à partir d'ARN de cancer du colon humain, alors qu'il est absent des tissus normaux adjacents. Ce variant, appelé CCK2Ri4sv (intron 4 containing splice variant), résulte de la rétention de l'intron 4, ce qui aboutit à l'ajout de 69 acides aminés dans la 3e boucle intracellulaire [141]. Il a également été identifié dans les tissus cancéreux pancréatiques [142] et dans les cellules mononucléées du sang périphérique [143]. Pour expliquer l'épissage aberrant du CCK2Ri4sv, une équipe a proposé une diminution de l'expression d'une protéine impliquée dans la machinerie d'épissage, la protéine U2AF35. Il s'agit d'un facteur d'épissage auxiliaire de la famille des petites ribonucléoprotéines nucléaires U2 dont l'expression est plus faible dans les tissus pancréatiques cancéreux que dans les tissus normaux [144].

Hellmich a décrit ce variant comme induisant des oscillations de calcium intracellulaire et augmentant la prolifération cellulaire indépendamment de la présence de son ligand, lorsqu'il est transfecté dans des cellules Balb3T3. Cependant ces résultats n'ont pas pu être confirmés dans d'autres systèmes cellulaires, tels que les cellules CHO dans une étude menée par Cheng [145], ou les cellules COS-7 (résultats non publiés par notre équipe). Néanmoins, Cheng observe les effets décrits par Hellmich lorsque le variant est activé par la gastrine ou la CCK [145]. D'autre part, l'expression du CCK2Ri4sv reste controversée dans les cancers digestifs, puisqu'elle n'a pas été retrouvée dans l'étude menée par Körner. Par contre, celui-ci le détecte en très faible quantité dans 100% des insulinomes et des GIST (Gastrointestinal Stromal Tumor) testés, et dans 67% des cancers du poumon à petites cellules [146].

Un autre variant provenant d'une mutation ponctuelle transformant la Valine en position 286 en Phénylalanine a été identifié chez un patient atteint d'un cancer colorectal. Cet acide aminé est situé au niveau de la 3e boucle intracellulaire, connue pour son rôle dans la transduction du signal des RCPG. Cette mutation n'affecte pas la liaison des ligands au récepteur, en revanche toutes les voies de transduction du signal de ce mutant sont inactivées [147].

CCK₂ receptors in cancer: incidence and density

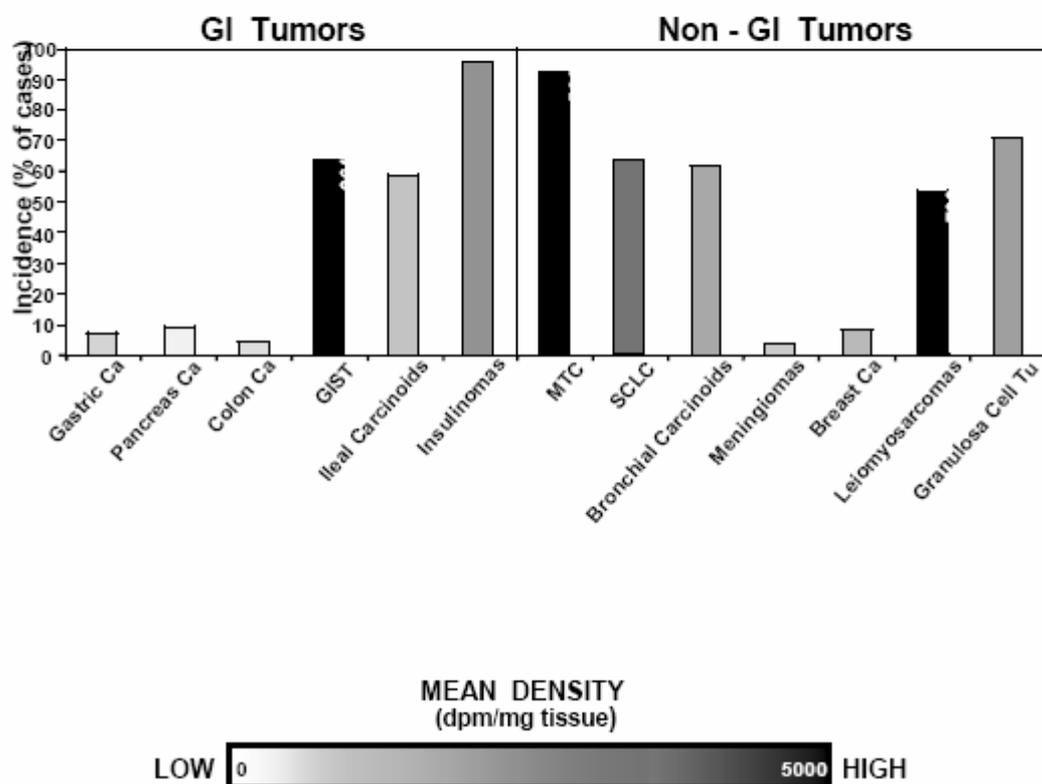


Figure 10: Incidence du RCCK2 dans les cancers.

La densité moyenne de RCCK2 détecté dans les cancers par autoradiographie (dpm/mg tissu) est représentée par l'intensité de la gamme de gris, de 0 à 5000 dpm/mg tissu. Lorsque cette valeur est supérieure à 5000, histogramme est représenté en noir. Ca : carcinome, Tu : tumeur [48].

D.3. Surexpression du récepteur CCK2 dans les tissus tumoraux

Le récepteur CCK2 a été identifié dans un grand nombre de cancers, parmi lesquels les tumeurs neuroendocrines occupent une place prépondérante (Figure 10) [48].

En dehors du système digestif, il est clairement établi que les cancers du poumon à petites cellules expriment fréquemment le RCCK2 (57%), tant au niveau transcriptionnel que traductionnel, contrairement aux cancers du poumon non à petites cellules [49, 148, 149].

D'autre part, la détection du RCCK2 par autoradiographie a montré de façon incontestable l'incidence très importante de ce récepteur dans les carcinomes médullaires de la thyroïde (MTC) (92%), alors qu'il n'est pas présent dans les cancers différenciés de la thyroïde [150]. Cette caractéristique est utilisée pour le diagnostic des MTC, grâce à l'injection de pentagastrine chez les patients. En effet, l'activation du RCCK2 exprimé dans les cellules C de la thyroïde va entraîner la sécrétion de calcitonine. La concentration plasmatique de cette hormone est révélatrice de la présence d'un MTC [71]. Une autre technique de détection des MTC par scintigraphie, basée sur l'utilisation d'analogues radiomarqués des ligands du RCCK2, est actuellement en cours d'essai clinique (voir section D.4. Développement de radio-ligands pour la scintigraphie du récepteur CCK2). De plus, le RCCK2 est fréquemment exprimé dans les cancers ovariens du stroma (100%), dans les astrocytomes (65%) et dans les leiomyosarcomes (50%) [49, 151]. Il est également trouvé de façon occasionnelle dans les adénocarcinomes du sein et de l'endomètre [48, 49].

La détection de la gastrine par hybridation *in situ* parallèlement à la présence du RCCK2 dans la majorité des cancers du poumon à petites cellules, du sein et des ovaires suggère une fois encore l'existence d'une boucle de régulation autocrine dans ces tumeurs [49].

Au niveau digestif, des études d'autoradiographie montrent que très peu de cancers épithéliaux du pancréas, du colon et de l'estomac expriment le RCCK2 [48]. Par contre, il est souvent exprimé dans les tumeurs neuroendocrines gastrointestinales, en particulier dans les insulinomes [11]. Il est également présent dans les tumeurs stromales gastrointestinales (GIST) ainsi que dans les métastases qui en découlent. En effet, une étude a montré que le RCCK2 était exprimé en très forte densité dans 63% des GIST [47].

Bien que plusieurs variants du RCCK2 aient été identifiés dans les cancers digestifs, aucune étude n'a été réalisée en ce sens concernant les tumeurs neuroendocrines. Seul le

variant CCK2Ri4sv a été recherché spécifiquement et identifié dans ces tumeurs. C'est pourquoi il nous est apparu important de procéder au criblage de plusieurs tumeurs neuroendocrines afin de rechercher les formes variantes du RCCK2. Ce travail a mené à la découverte d'un nouveau variant d'épissage, le RCCK2-ΔE2 délété de l'exon 2, dont les caractéristiques sont détaillées dans l'article I de la partie Résultats.

Le RCCK2 constitue donc une cible importante pour le diagnostic et la thérapie des tumeurs qui le surexpriment. Cependant, son rôle dans la carcinogenèse de ces tumeurs n'a pas été étudié.

D.4. Développement de radio-ligands pour la scintigraphie du récepteur CCK2

Après la découverte de la très forte incidence et densité d'expression du récepteur CCK2 dans les MTC, plusieurs équipes ont commencé à développer des radio-ligands spécifiques de ce récepteur. La première génération de composés était basée sur des analogues de CCK non sulfatés, couplés à des chelateurs tels que le DTPA ou le DOTA. Ces analogues marqués à l'indium 111 ont produit des résultats encourageants après leur injection chez plusieurs patients, chez lesquels ils ont permis de marquer les lésions de MTC [152]. Cependant, leur accumulation dans les tumeurs n'était pas suffisante pour des applications cliniques.

En parallèle, des analogues de gastrine radiomarquée ont été développés. Notamment, Behr et ses collègues ont développé la [¹¹¹In-DTPA⁰]minigastrine qui a montré une forte rétention dans l'estomac et la tumeur chez des patients atteints de MTC [153]. Récemment, le remplacement de l'isotope ¹¹¹In par le ^{99m}Tc (Technétium) a permis d'améliorer la visualisation des lésions de MTC [154]. Cependant, un inconvénient majeur de la gastrine radiomarquée est sa rétention rénale très élevée, qui implique un important risque de néphrotoxicité [48].

Il a été découvert que la rétention rénale était liée à la présence de 5 acides glutamiques dans la séquence de la gastrine [155]. De nouveaux analogues de gastrine dépourvus de cette séquence ont été développés (MG11) et testés chez des souris transplantées avec une xénogreffe de cellules AR42J exprimant le récepteur CCK2. Cette délétion a permis de diminuer leur rétention rénale d'un facteur 20, avec toutefois une baisse du marquage de la tumeur d'un facteur 3 [156]. Cependant les analogues radiomarqués de

minigastrine MG11 présentent une faible stabilité *in vivo*, car ils sont susceptibles à la dégradation enzymatique. Ces inconvénients ont pu être surmontés grâce à la cyclisation de la minigastrine [157] ou à l'utilisation d'agent de pontage neutre et hydrophile pour la liaison du chélateur [158].

Actuellement de nombreux efforts de recherche sont réalisés afin d'améliorer les propriétés des analogues de CCK et de gastrine, dont un certain nombre est en cours d'études pré-cliniques et cliniques [159].

Le ciblage thérapeutique grâce à l'utilisation de radio-ligands a grandement amélioré l'efficacité de la radiothérapie. De plus, les effets secondaires sévères de la radiothérapie spécifique des récepteurs sont relativement rares, notamment en comparaison de la chimiothérapie conventionnelle.

Parallèlement aux radio-ligands, de nouvelles plateformes polyvalentes de ciblage diagnostique et thérapeutique ont été développées, grâce à l'essor des nanotechnologies.

Chapitre III : Les nanoparticules, nouvelle plateforme diagnostique et thérapeutique

Le développement des nanotechnologies a ouvert de nombreuses opportunités, notamment dans le domaine médical. Les particules de taille nanométrique (1-200 nm) sont dans la même gamme de dimension que les anticorps, les récepteurs membranaires, les acides nucléiques et les protéines. Cette caractéristique confère aux nanoparticules des propriétés optiques, électroniques et magnétiques uniques, qui ne sont pas retrouvées dans les matériaux à l'état brut. Les études actuelles montrent que les nanoparticules constituent de puissants outils pour les applications biomédicales, notamment en tant que sondes diagnostiques et transporteurs de médicaments.

Afin de rendre les nanoparticules biocompatibles et biodégradables, il est nécessaire d'enrober le cœur de la nanoparticule avec des molécules polymériques. Cet enrobage est essentiel car il assure la solubilité des nanoparticules et évite leur agrégation. Il peut être utilisé pour la liaison de ligands assurant la vectorisation des nanoparticules, et il permet la conjugaison de quantités importantes de médicaments. De plus, la nature et les propriétés physico-chimiques de l'enrobage vont déterminer la biodistribution des nanoparticules dans l'organisme.

En premier lieu, ce chapitre expose les principaux types de nanoparticules développées pour leurs applications biomédicales (Figure 11), en raison de leurs propriétés thérapeutiques et diagnostiques intrinsèques, ou de leur capacité à transporter des médicaments. Une attention particulière sera ensuite portée aux nanoparticules d'oxyde de fer, dont les propriétés magnétiques et la biocompatibilité constituent un atout majeur pour leur utilisation chez l'homme. Enfin, la biodistribution des nanoparticules sera abordée en détail dans la dernière partie.

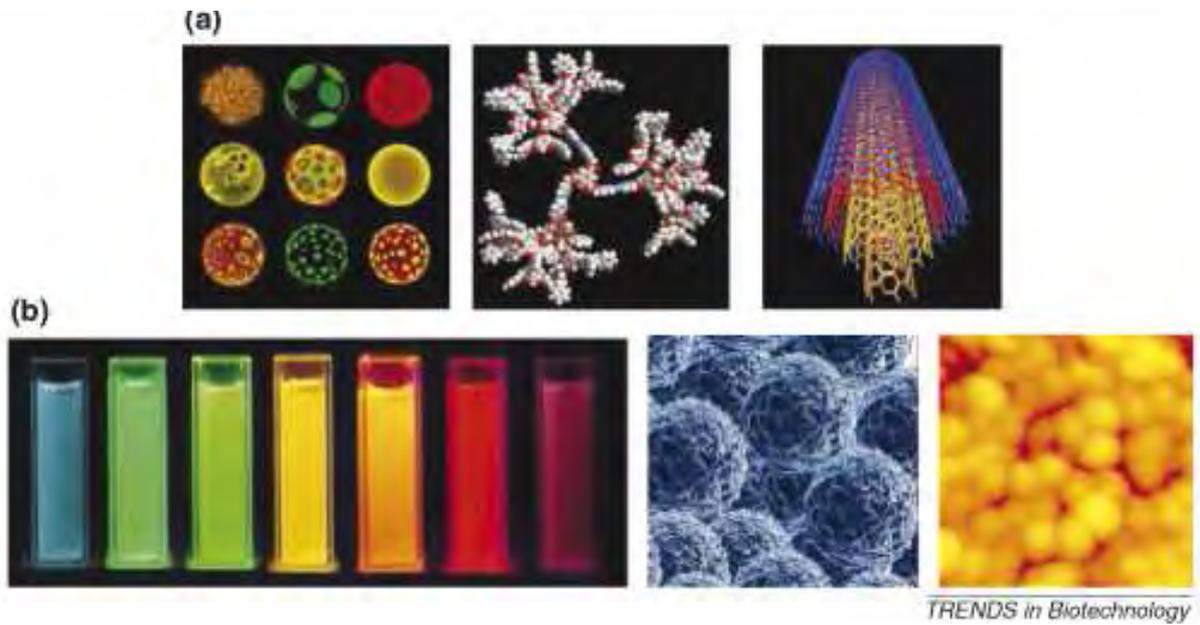


Figure 11: Exemples de nanoparticules utilisées pour des applications biomédicales.

- a) Nanoparticules organiques. De gauche à droite : liposomes, dendrimères et nanotubes de carbone.
- b) Nanoparticules inorganiques. De gauche à droite : quantum dots, nanoparticules magnétiques et nanoparticules d'or [160].

A/ Exemples de nanoparticules développées pour des applications biomédicales

A.1. Nanoparticules organiques

A.1.1. Liposomes et nanoparticules polymériques

Les liposomes sont des vésicules composés de phospholipides dont la bicouche externe entoure un espace central aqueux. D'un diamètre de 50 à 100 nm, les liposomes sont classifiés en fonction de leur taille et du nombre de leurs couches, en multi-, oligo- ou uni-lamellaires. Leur nature amphiphile permet aux liposomes de transporter des médicaments hydrophiles encapsulés dans la cavité intérieure, et des drogues hydrophobes dans la membrane. De par leurs caractéristiques physico-chimiques, les liposomes présentent de très bonnes propriétés de circulation, de pénétration et de diffusion [160].

Les formulations liposomales ont été développées pour améliorer l'index thérapeutique des agents chimiothérapeutiques conventionnels. La plus courante repose sur l'encapsulation de la doxorubicine dans un liposome entouré d'une couche de polymère, le polyéthylène glycol ou PEG (Doxil[®]). Cette formulation présente des effets anti-tumoraux significatifs dans les cancers métastatiques du sein, des ovaires, du sarcome de Kaposi, des carcinomes hépatocellulaires et des lymphomes cutanés des cellules T, sans les effets secondaires observés lors des traitements conventionnels par la doxorubicine [161, 162]. La vectorisation de liposomes avec de l'acide folique ou un anticorps dirigé contre le récepteur de la transferrine a permis de s'affranchir des mécanismes de résistance multiple aux médicaments [163].

La libération du contenu des liposomes dans la cellule peut se faire grâce à la fusion du liposome avec la membrane plasmique, ou peut être effectuée suite à une déstabilisation du liposome par des composés de la membrane lorsqu'il se trouve à proximité d'une cellule. Le liposome peut également être endocyté, pour ensuite fusionner avec les lysosomes [164].

Les liposomes sont également utilisés pour le transport d'acides nucléiques, ou encore de protéines et de peptides, tels que l'insuline [165] ou l'interleukine 2, ce qui a permis de réduire la présence des métastases dans le foie de souris transplantées avec des xénogreffes tumorales [166]. Enfin, les liposomes peuvent être utilisés pour l'imagerie, en incluant des sondes radioactives ou paramagnétiques dans leur formulation [167].

Malgré leur succès pour un certain nombre d'applications cliniques, les transporteurs liposomaux sont limités par leur faible capacité de stockage et un profil de diffusion rapide des principes actifs *in vivo*. De plus, le volume limité de la bicouche lipidique rend inefficace l'adressage de médicaments hydrophobes [168].

Pour palier à ces inconvénients, des nanoparticules polymériques ont été développées. Les polymères amphiphiles, tels que l'association spontanée des micelles, de polymères ou de copolymères, permettent d'encapsuler des médicaments par un mécanisme chimique, électrostatique ou physique. De plus, ces systèmes peuvent être conçus pour libérer le principe actif de manière contrôlée, et permettent d'éviter les mécanismes de résistances multiples aux médicaments [169, 170][160]. De nombreuses nanoparticules polymériques sont maintenant à différentes étapes d'études pré-cliniques et cliniques pour le transport d'agent chimiothérapeutiques. Par exemple, le Genexol[®]-PM est actuellement en étude clinique de phase II pour le transport du paclitaxel dans le traitement des cancers avancés du poumon non à petites cellules [171], et le SP1049C est évalué pour le transport de doxorubicine dans le traitement en première ligne des adénocarcinomes métastatiques inopérables de l'œsophage [162]. Ces formulations ont montré une efficacité supérieure à celle du principe actif seul.

A.1.2. Dendrimères

Un dendrimère est une molécule polymérique composée de monomères (dendrons) parfaitement branchés qui émanent de façon radiale d'un cœur central (Figure 12). Le nombre de points de branchement rencontrés à partir du cœur sur un dendron définit sa génération (G-1, G-2, G-3, ...). Les dendrimères les plus utilisés sont composés de polyamidoamine (PAMAM) ou de polypropylène imines (PPI), mais ils peuvent également être composés de polyamines ou polypeptides, de polyamides, de polyesters, ou encore de carbohydrates [172].

Contrairement aux polymères conventionnels et aux micelles polymériques, les dendrimères possèdent une structure dendritique unique avec des caractéristiques attractives, telles qu'une taille nanométrique, une suspension monodisperse, une structure globulaire rigide avec une importante stabilité physique, et un grand nombre de fonctionnalités périphériques permettant de nombreuses modifications chimiques [173]. Il est possible d'obtenir une structure possédant des terminaisons hydrophiles, afin de solubiliser le dendrimère, tout en conservant un cœur hydrophobe [174].

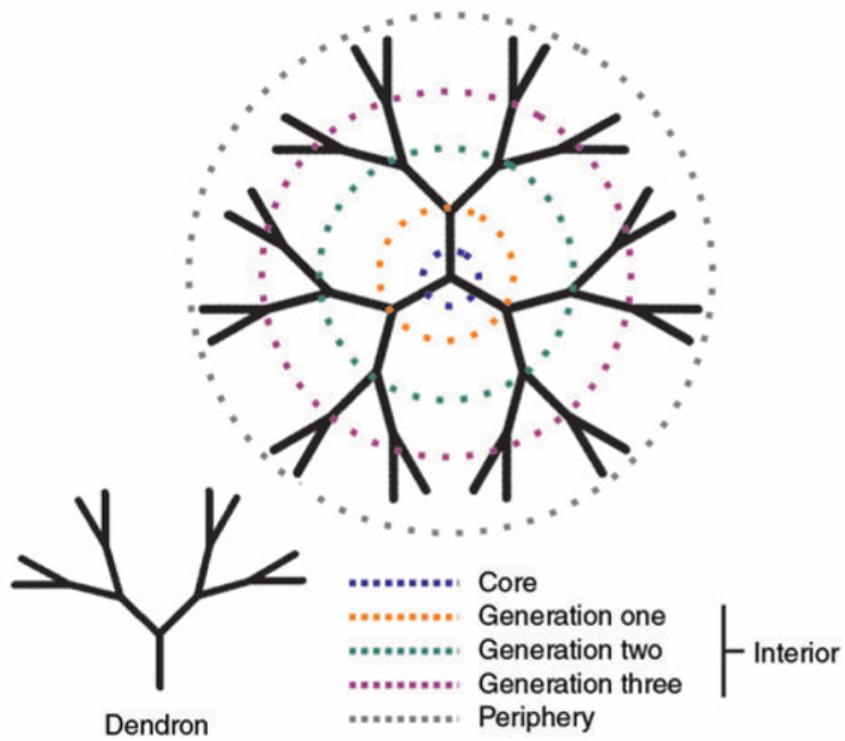


Figure 12: Structure schématique d'un dendrimère.

Le dendrimère et le dendron sont représentés par les lignes en continu. Les lignes en pointillé représentent les différentes régions clés d'un dendrimère [172].

Les dendrimères sont utilisés pour isoler des molécules qui ne sont pas compatibles avec leur environnement, telles que l'adriamycine et le méthotrexate [175]. La forte capacité de chargement de ces nanostructures permet de baisser la dose d'agents anti-cancéreux administrée, ce qui diminue les effets secondaires et augmente l'index thérapeutique. Des agents de contraste peuvent également être encapsulés pour l'imagerie par IRM. La grande quantité de Gadolinium chélaté avec le DTPA (Gd-DTPA) encapsulée dans des dendrimères PAMAM permet d'obtenir une augmentation de la relaxation longitudinale, ce qui améliore l'intensité du signal. De plus, la conjugaison dans le dendrimère peut augmenter la stabilité du complexe Gd-DTPA [176].

Les dendrimères sont également utilisés en tant que transporteur de « gène médicament ». Par rapport aux vecteurs viraux, les vecteurs non viraux classiques présentent l'avantage d'être inoffensifs et flexibles, mais ils manquent d'efficacité. Les dendrimères cationiques constituent un nouveau polymère tridimensionnel qui a la capacité d'établir des interactions électrostatiques avec les différentes formes d'acides nucléiques, telles que l'ADN plasmidique, les oligonucléotides antisens et l'ARN pour former des complexes qui les protègent de la dégradation [177].

La toxicité des dendrimères a été largement évaluée *in vitro* sur différents modèles cellulaires. Celle-ci serait liée aux charges de surface, à la génération du dendrimère et à la concentration utilisée. Les dendrimères PAMAM cationiques perturbent l'intégrité de la membrane cellulaire, ce qui entraîne la libération de l'enzyme lactodéhydrogénase et la formation de pores dans la membrane [169]. Pour palier à ces problèmes de cytotoxicité, plusieurs approches ont été développées pour modifier les charges cationiques de surface. L'ajout d'une couche de PEG a permis de réduire fortement les effets cytotoxiques, y compris chez l'animal [172].

A.1.3. Nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone sont constitués de feuilles de graphène enroulées et coiffées à chacune de leurs extrémités par des héli-fullerènes, qui forment un cylindre caractérisé par un ratio longueur/diamètre élevé. Ils sont classés en fonction du nombre de feuilles de graphène utilisées : les nanotubes possédant une paroi simple ont un diamètre de 0,3-2 nm avec une longueur de 1 μm , alors que ceux possédant une paroi multiple ont un diamètre de 2-10 nm et une longueur pouvant aller jusqu'à quelques micromètres. Les nanotubes de carbone sont caractérisés par leurs propriétés spectroscopiques, thermiques et électriques uniques, qui

facilitent leur détection dans des environnements biologiques [160]. Ils peuvent être visualisés par photoluminescence dans le spectre proche de l'infrarouge, par la diffusion Raman de surface exaltée ou par la technologie photo-acoustique (voir section A.2.2. Nanoparticules d'Or). La diffusion de Raman de surface exaltée (SERS : surface-enhanced Raman scattering) a lieu lorsqu'un matériau, exposé à la lumière, subit une augmentation du champ magnétique local, amplifiant ainsi les signaux spectroscopiques des molécules à la surface du matériau. La spectroscopie de Raman permet de s'affranchir de l'autofluorescence, car elle est basée sur un phénomène de diffusion au lieu du tandem absorption/émission de l'imagerie classique de fluorescence. Des éléments radioactifs peuvent également être greffés à la surface de la molécule d'enrobage pour réaliser une imagerie en PET [178, 179].

L'utilisation des nanotubes de carbone *in vivo* en est encore aux étapes préliminaires de recherche. Cependant leur capacité de chargement en médicaments est bien supérieure à celle d'autres transporteurs tels que les liposomes ou les dendrimères [180]. La liaison de paclitaxel à la surface des nanotubes de carbone a montré une efficacité anti-tumorale supérieure au principe actif seul, chez des souris transplantées avec des xénogreffes de cellules 4T1 de cancer du sein [181].

D'autre part, ils sont utilisés pour la transfection de cellules résistantes aux techniques conventionnelles. En effet, ils sont internalisés de façon spontanée dans plusieurs types cellulaires par endocytose non spécifique grâce à des interactions avec les domaines hydrophobes de la membrane plasmique. Par exemple, l'efficacité de transfection de cellules T avec des siARN (small interfering ARN) et des oligonucléotides antisens conjugués aux nanotubes de carbone est supérieure à celle des liposomes [182].

Des études menées *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'exposition à des nanotubes de carbone en présence d'un champ de radiofréquence entraînait la destruction thermique de cellules cancéreuses. En effet, ceux-ci ont la capacité d'absorber les radiations proches de l'infrarouge pour les convertir en chaleur [183].

Plusieurs études cellulaires ont montré une cytotoxicité dose-dépendante des nanotubes de carbone, liée notamment à la production de radicaux oxygénés et au déclenchement d'une réponse inflammatoire [184]. Ils ont également des effets génotoxiques *in vivo*, comme le rapporte une étude menée chez le rat [185]. La toxicité peut être réduite grâce à l'optimisation de la chimie de surface et la diminution de la production d'impuretés résiduelles lors des processus de synthèse [184].

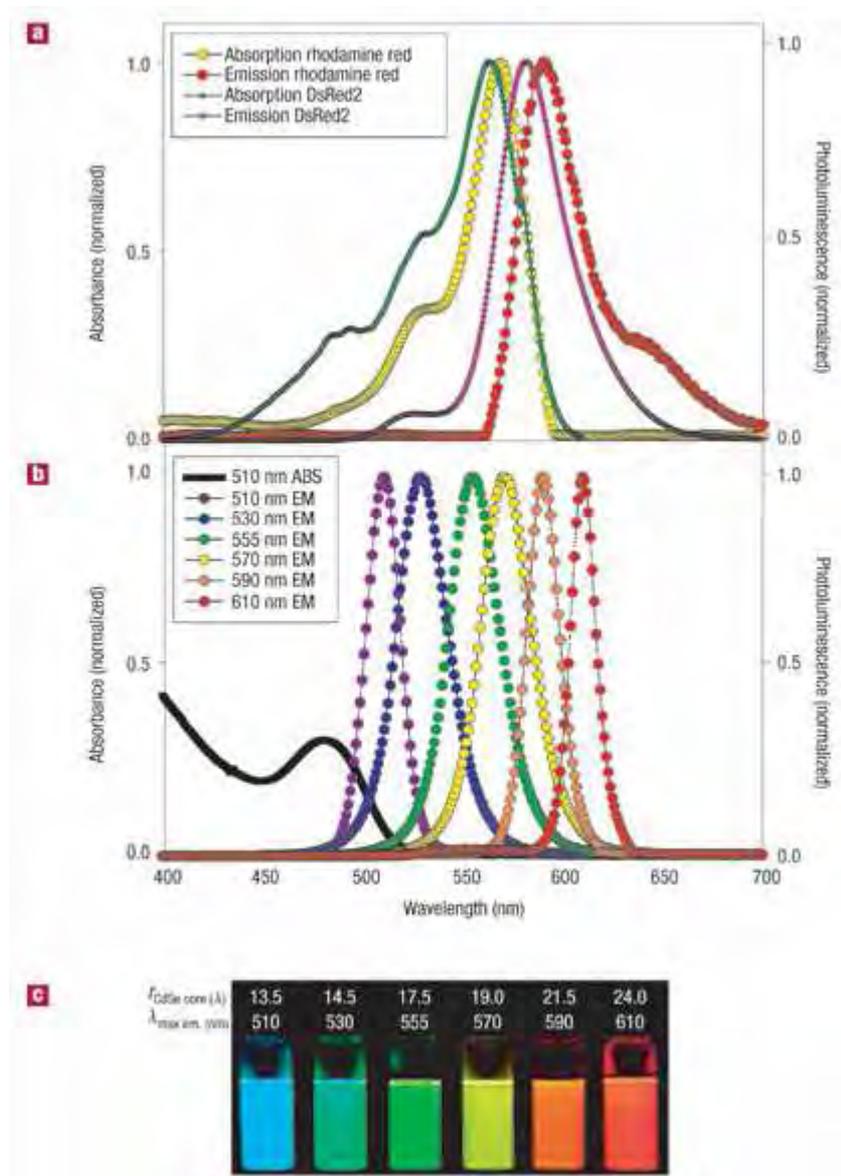


Figure 13: Caractéristiques spectrométriques des Quantum dots [186].

A.2. Nanoparticules inorganiques

A.2.1. Quantum Dots

Les quantum dots sont des nanocristaux semi-conducteurs dont les dimensions sont inférieures à 10 nm. En comparaison des sondes fluorescentes conventionnelles, c'est-à-dire les fluorochromes organiques et les protéines fluorescentes, les quantum dots possèdent des propriétés optiques et électroniques uniques. En effet, ils sont caractérisés par un fort rendement quantique, un coefficient d'extinction molaire élevé, un spectre de photoluminescence pouvant aller de l'ultraviolet à l'infrarouge, une forte résistance au photoblanchiment, et une très bonne résistance aux dégradations chimiques et photoniques [160].

De plus, les quantum dots ont la particularité de posséder un large spectre d'excitation qui permet d'exciter une population hétérogène de quantum dots par une longueur d'onde unique, et un spectre d'émission qui dépend de la taille du cœur de la nanoparticule. Plus la taille de la nanoparticule est importante, plus le spectre d'émission se rapproche du rouge, et inversement plus la taille est réduite plus il se rapproche du bleu (Figure 13) [159, 178].

Grâce à leur extrême photostabilité, les quantum dots servent de sondes pour suivre le trafic de molécules en temps réel sur de longues périodes. Des anticorps, des ligands, ou des aptamères peuvent être fixés à la surface des nanoparticules pour cibler spécifiquement différentes protéines dans la cellule [179, 180]. Ils permettent également l'étude dynamique des mécanismes cellulaires tels que la migration, la différenciation et le devenir de la cellule [186].

L'utilisation des quantum dots *in vivo* grâce à des excitations dans le rouge lointain ou le proche infrarouge a permis de résoudre une partie des problèmes liés à l'auto-fluorescence des tissus. De plus, les propriétés spectroscopiques des quantum dots permettent une imagerie de tissus plus profonds que les sondes organiques. La possibilité de suivre des cellules marquées *in vivo* sans avoir systématiquement recours au sacrifice de l'animal constitue une grande avancée par rapport aux techniques classiques [186].

Le cœur central des quantum dots est composé de combinaison d'éléments chimiques appartenant principalement à la catégorie des métaux lourds. Les quantum dots dont la chimie est actuellement la mieux maîtrisée sont composés d'un cœur de séléniure de cadmium (CdSe) enrobé d'une couche de sulfure de zinc (ZnS). La couche de ZnS neutralise la surface

du cœur de la nanoparticule, le protège de l'oxydation, empêche la fuite de Cd ou Se dans le milieu environnant, et améliore grandement le rendement de photoluminescence [186].

Des effets cytotoxiques liés à la fuite d'ions Cd²⁺ et à la production de radicaux oxygénés ont été observés sur différentes lignées cellulaires [187, 188]. Néanmoins, plusieurs études ont montré que la toxicité des quantum dots pouvait, dans une certaine mesure, être réduite en fonction du choix de l'enrobage [189], en modulant les charges de surface [190], la taille globale de la nanoparticule [191], ou en fonction de la dose globale de quantum dots utilisée [192]. En alternative au cadmium, des quantum dots constitués d'un cœur de phosphore d'indium (InP) ont été développées afin de diminuer la toxicité de ces nanoparticules. L'utilisation d'une double couche de ZnS permet de réduire la production de radicaux oxygénés, sans l'éliminer totalement [193].

A.2.2. Nanoparticules d'Or

Les nanoparticules d'or sont des nanoparticules métalliques. Elles peuvent être synthétisées selon différentes géométries, sous forme de nanosphères, de nanotubes, ou de nanocages. Lorsque les nanoparticules d'or sont exposées aux radiations lumineuses, le champ électrique de la lumière entraîne l'oscillation collective des électrons de la bande de conduction à la surface de la nanoparticule. L'oscillation cohérente des électrons libres du métal en résonance avec le champ électromagnétique est appelée résonance plasmonique de surface (SPR) [160]. Pour les nanoparticules d'or, cette résonance a lieu dans le spectre visible à environ 520 nm, à l'origine de la couleur rouge des nanoparticules en solution. Ces propriétés sont dépendantes de la taille et de la forme des nanoparticules [194]. Lorsqu'il est excité à la longueur d'onde correspondant à la résonance surface plasmonique, l'effet photo-acoustique généré par les nanoparticules d'or permet une meilleure sensibilité de l'image et de sa résolution. La bonne photostabilité des nanoparticules d'or, par rapport aux colorants organiques, en fait de puissants outils pour l'imagerie médicale. De plus, elles permettent de s'affranchir de l'autofluorescence des tissus [168]. Le signal obtenu est 3 fois supérieur à celui des tissus, ce qui permet d'imager une section de tissu jusqu'à 75 µm de profondeur [194]. Les nanoparticules d'or sont également à l'étude pour d'autres techniques d'imagerie, telles que l'imagerie par luminescence bi-photonique, ou les rayons X [168].

Dans le cadre de l'imagerie basée sur la fluorescence, les quantum dots semi-conducteurs, qui ont une émission plus forte, plus resserrée et plus ajustable, offrent une

image plus sensible et plus efficace. Cependant, ils ne possèdent pas de propriétés photothermiques, contrairement aux nanoparticules métalliques. De plus, la fonctionnalisation des nanoparticules d'or avec des molécules biologiques est facile, contrairement aux quantum dots qui requièrent une solubilisation à l'aide d'acide mercaptoacétique ou de silane [194]. Les nanoparticules d'or sont prometteuses pour leurs applications médicales car elles sont faciles à synthétiser, biocompatibles et non toxiques [195].

Enfin, elles constituent de bons candidats pour la thérapie photothermique. Sous l'irradiation d'un laser, la résonance plasmonique de surface couplée avec un fort coefficient d'absorption aboutit à la génération de chaleur étroitement localisée. En optimisant les propriétés physiques des nanostructures, telles que la taille, la forme et l'état d'aggrégation, leur maximum d'absorption peut être déplacé dans le spectre proche de l'infrarouge, permettant une pénétration profonde dans les tissus. La thérapie ciblée grâce à l'utilisation de nanoparticules d'or a été appliquée avec succès *in vitro* et *in vivo* [196-198].

Cependant les nanoparticules d'or n'en sont encore qu'à l'étape de leur développement en laboratoire, contrairement aux nanoparticules magnétiques, qui sont déjà utilisées en clinique. Les nanoparticules d'or sont largement utilisées en tant que sondes pour visualiser les composants de cellules vivantes, en particulier l'interaction de principes actifs avec leurs cibles pharmacologiques dans des cellules cancéreuses vivantes [199].

A.2.3. Nanoparticules magnétiques

L'IRM est une technique non invasive qui fournit en temps réel des informations sur les tissus mous avec une forte résolution. La qualité de l'image IRM peut être largement améliorée avec l'utilisation d'agents de contraste qui vont altérer les taux de relaxation des protons. Tout d'abord, des chélatons de Gadolinium ont été utilisés, mais leur sensibilité s'est avérée relativement faible, et elle décroît davantage lorsque les complexes sont internalisés dans les cellules. De plus le Gadolinium n'est pas biocompatible, et peu de données sont disponibles concernant sa toxicité après sa déchélation dans la cellule au cours du temps [200, 201]. Des cas de fibroses systémiques néphrogéniques ont également été observés chez des patients souffrant d'insuffisance rénale [202, 203]. C'est pourquoi d'autres agents de contraste ont été développés. La plupart des matériaux avec un fort moment magnétique, tel que le cobalt ou le nickel, sont toxiques et susceptibles de subir une oxydation, ce qui limite leurs applications biomédicales. Par contre, les nanoparticules

d'oxyde de fer sont adaptées pour des applications *in vivo*, car elles sont biocompatibles et biodégradables. De plus, elles présentent une bonne stabilité chimique et des techniques de synthèse relativement simples [204]. Actuellement, plusieurs types de nanoparticules d'oxyde de fer ont été approuvés pour des utilisations cliniques d'imagerie médicale et d'applications thérapeutiques (voir section B/ Nanoparticules d'oxyde de fer) [168, 205, 206].

L'avantage des nanoparticules magnétiques par rapport aux autres vecteurs (tels que les micelles, les nanoparticules polymériques, les liposomes) est que leurs propriétés magnétiques permettent le suivi et la quantification de leur biodistribution en IRM, et donc, indirectement, du médicament associé aux nanoparticules. Cet élément est crucial, notamment dans la chimiothérapie anti-cancéreuse, dans laquelle la dose optimale est critique non seulement pour obtenir la régression de la tumeur, mais aussi pour empêcher l'apparition de mécanismes de résistance entraînant une rechute [201, 202].

Les nanoparticules magnétiques enrobées de polymères cationiques, tels que le polyéthylène imine (PEI), le polyamidoamine ou le chitosan, sont utilisées pour le transport d'oligonucléotides [207-209]. Leurs charges positives vont se complexer avec les charges négatives des acides nucléiques. Ces interactions ioniques protègent les acides nucléiques de la dégradation enzymatique, et favorisent leur internalisation et leur libération dans les endosomes [210].

Les nanoparticules magnétiques sont également utilisées dans le cadre des thérapies cellulaires, pour suivre le devenir de cellules injectées *in vivo*, notamment dans le cas de cellules progénitrices, de cellules souches ou de cellules dendritiques [211]. Dans le cadre de la thérapie cellulaire vaccinnante, des cellules dendritiques chargées en nanoparticules magnétiques ont été modifiées *in vitro* pour présenter des peptides antigéniques dérivés de tumeurs. Ces cellules ont été injectées dans les ganglions lymphatiques de patients atteints d'un mélanome de stade III. L'imagerie de la migration de ces cellules en IRM a été obtenue avec une résolution supérieure à la scintigraphie de ces mêmes cellules chargées avec un isotope radioactif [183].

Afin de marquer les cellules de façon efficace, il est nécessaire que les nanoparticules soient internalisées massivement. Des magnétoliposomes ont été développés en ce sens. Il s'agit de vésicules uni-lamellaires de taille importante qui renferment des nanoparticules magnétiques [212]. Il existe également des magnétodendrimères, qui sont des nanoparticules d'oxyde de fer enrobées d'un dendrimère. Leur structure branchée fortement chargée permet aux dendrimères de se lier à la cellule en de multiples sites, entraînant la déformation de la

membrane plasmique et leur endocytose. De plus, la présence des dendrimères facilite la conjugaison d'agents cytotoxiques [213, 214].

Les nanoparticules de fer pur présentent des propriétés magnétiques et hyperthermiques nettement supérieures aux autres nanoparticules magnétiques. Cependant, leur utilisation en médecine est actuellement limitée à cause de la difficulté de leur synthèse et de leur instabilité chimique. En effet, elles ont une forte tendance à s'oxyder en présence d'eau et d'oxygène. Pour éviter ce phénomène, elles sont protégées par des enrobages d'or ou de silice. Malgré des processus de synthèse complexes, la recherche continue pour ces nanoparticules métalliques dont le potentiel médical est très prometteur [215].

B/ Nanoparticules d'oxyde de fer

Introduites pour la première fois au milieu des années 80, les nanoparticules d'oxyde de fer sont composées d'un cœur de magnétite (Fe_3O_4) ou de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) d'un diamètre de 5 à 10 nm enrobé d'un polymère soluble dans l'eau. Depuis, elles ont connues un développement fulgurant en tant qu'agent de contraste pour la détection, le diagnostic et la thérapie des tumeurs solides.

B.1. Superparamagnétisme et Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

De nos jours, l'IRM est l'une des techniques d'imagerie non invasive les plus performantes. L'IRM est basée sur la propriété des protons de l'hydrogène à s'aligner par rapport à un champ magnétique B_0 . Lorsque l'on applique ensuite un pulse de radiofréquence, ces protons sont perturbés par rapport à B_0 . Le phénomène de relaxation correspond au processus de retour des protons à leur état d'origine. Deux événements indépendants, la relaxation longitudinale (R_1) et transversale (R_2), peuvent être enregistrés pour générer une image IRM. Les variations locales dans la relaxation, correspondant au contraste de l'image, proviennent de la densité des protons ainsi que de la nature physique et chimique des tissus [205]. Le signal issu de la relaxation peut être augmenté grâce à l'utilisation d'agents de contraste, tels que les nanoparticules d'oxyde de fer, qui ont des propriétés superparamagnétiques.

Le superparamagnétisme intervient lorsque la taille du cristal est plus petite que le domaine magnétique de la nanoparticule, c'est-à-dire inférieure à 30 nm. Chaque cristal est considéré comme un mono-domaine magnétique unique. En présence d'un champ magnétique externe, les cristaux d'oxyde de fer vont s'aligner et créer des gradients de champ magnétique locaux importants. Cela induit le déphasage des spins des protons de l'eau, qui se traduit par une réduction des temps de relaxation T1 et T2 de l'eau environnante. Cependant, la diminution du temps T1 requiert une interaction étroite entre les protons et l'agent de contraste, qui peut être gênée par l'épaisseur de l'enrobage des nanoparticules. Les nanoparticules d'oxyde de fer sont donc préférentiellement utilisées en tant qu'agent de contraste T2. Les nanoparticules superparamagnétiques sont habituellement utilisées pour fournir un contraste négatif plus important (hypo-intense), qui correspond à un obscurcissement de l'image [168, 206, 216].

Contrairement aux matériaux ferromagnétiques, les nanoparticules superparamagnétiques n'ont aucune rémanence magnétique en absence de champ magnétique externe [206]. Le comportement superparamagnétique d'une nanoparticule est dépendant de la taille du cœur mais également des modifications de surface. La nanoparticule doit être enrobée de façon adéquate afin de réduire les interactions magnétiques dipôle-dipôle [216].

Différentes applications cliniques sont possibles en fonction de la composition et de la taille des nanoparticules d'oxyde de fer, car ces paramètres vont influencer leur biodistribution (voir section B.3. Biodistribution des nanoparticules et influence de leurs caractéristiques physico-chimiques).

Les ferumoxides ont été les premières nanoparticules magnétiques développées pour l'imagerie du foie. On les appelle également SPION, pour Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticules. Ces nanoparticules, commercialisées en Europe depuis une 15^e d'années (Endorem[®] ou Feridex[®] IV aux Etats-Unis), ont une taille globale de 120-180 nm et sont enrobées d'un polymère composé de dextran. Lorsqu'elles sont injectées dans la circulation sanguine, leur demi-vie plasmatique est courte (8-30 min) car elles sont rapidement captées par les macrophages spécialisés du foie, ou cellules de Kupffer [206, 217, 218]. Actuellement, l'imagerie clinique des tumeurs et des métastases hépatiques grâce aux nanoparticules permet de détecter des lésions de seulement 2 à 3 mm [219]. Les tumeurs hépatiques sont dépourvues de cellules de Kupffer, contrairement au foie sain qui est fortement marqué par l'agent de contraste [206]. Le signal IRM du foie revient à son niveau basal au bout de quelques jours, les nanoparticules étant dégradées dans les phagolysosomes des macrophages [217].

Les ferumoxtrans sont composés d'un cœur monocristallin enrobé de dextran. Leur faible taille (30 nm) a permis d'augmenter leur demi-vie plasmatique de quelques minutes à plusieurs heures (25-30h) [218]. Ces nanoparticules, appelées USPIO (Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticules), sont captées par les macrophages des ganglions lymphatiques et de la moelle osseuse. La présence de métastases dans les ganglions lymphatiques est caractérisée par une absence de macrophages, et donc d'agent de contraste. Ces nanoparticules sont également utilisées pour l'imagerie des maladies inflammatoires et dégénératives, grâce à l'accumulation des macrophages chargés en nanoparticules au niveau des sites pathologiques [206]. Commercialisées sous les appellations Combidex[®] ou Sinerem[®], les USPIO permettent de détecter des métastases de 5 à 10 mm [200]. Dans une étude portant sur 33 patients elles ont permis la détection de 100% des métastases des ganglions lymphatiques, contre 29% en absence d'agent de contraste [220]. Les USPIO peuvent également être utilisées pour l'angiographie, et notamment pour visualiser l'angiogenèse tumorale [168].

Le ferumoxsil (Lumirem[®] ou Gastromark[®]) est une nanoparticule d'un diamètre de 300 nm, enrobée d'une couche de silicone inerte. Elle est administrée par voie orale pour l'améliorer le contraste entre le tube digestif et les organes voisins [206].

Plus récemment le ferumoxytol (Feraheme[®]) a été développé en tant qu'adjuvant ferrique. Le ferumoxytol est également en cours d'étude clinique pour la détection des inflammations du système nerveux central, des cancers et des métastases du cerveau [206].

De nombreux autres types de nanoparticules d'oxyde de fer sont en cours d'études pré-cliniques et cliniques. De plus, la vectorisation de ces nanoparticules offre un large éventail de possibilités pour la diversification de leurs applications cliniques en imagerie (voir section B.3.2. Adressage actif grâce à la vectorisation des nanoparticules).

B.2. Thérapie

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont des plateformes multifonctionnelles, qui combinent des caractéristiques diagnostiques et thérapeutiques. Grâce à leurs propriétés d'imagerie, les nanoparticules magnétiques permettent le suivi en temps réel de l'efficacité du ciblage du médicament qui leur est associé, tels que les gènes thérapeutiques, les protéines (anticorps ou peptides thérapeutiques) et les molécules cytotoxiques [205]. Cette partie

développe les deux principales applications thérapeutiques des nanoparticules d'oxyde de fer, qui sont le transport d'agents chimiothérapeutiques et l'hyperthermie.

B.2.1. Transport d'agents chimiothérapeutiques

L'administration conventionnelle des agents chimiothérapeutiques est souvent problématique à cause de leur toxicité aiguë liée à leur manque de spécificité. Pour palier à ce problème, des nanoparticules polyvalentes ont été développées. Ces « nanotransporteurs » permettent également de résoudre d'autres problèmes associés aux médicaments, tels que leur faible solubilité aqueuse, leur mauvaise biodisponibilité et des propriétés pharmacocinétiques défavorables. De plus, des études ont montré que les nanoparticules qui transportent des médicaments permettaient de surmonter les problèmes liés aux mécanismes de résistance multiple aux médicaments (MDR : multidrug resistance), lié notamment à la surexpression de la glycoprotéine d'efflux P (Pgp) [221, 222]. Par exemple, la conjugaison de la daunorubicine avec des nanoparticules d'oxyde de fer a permis de surmonter la résistance des cellules leucémiques K562 aux anthracyclines [216].

La conjugaison de médicaments avec des nanoparticules magnétiques doit prendre en compte plusieurs paramètres, tels que la capacité de chargement, le profil de libération, la stabilité et la dispersion aqueuse, et la préservation des propriétés magnétiques des nanoparticules.

Plusieurs approches ont été développées pour intégrer les molécules chimiothérapeutiques aux formulations des nanoparticules magnétiques. Elles peuvent être liées de façon covalente avec un agent de liaison clivable, ou par des interactions hydrophobes au sein de l'enrobage de la nanoparticule [210].

La libération des molécules chimiothérapeutiques associées aux nanoparticules d'oxyde de fer par des liaisons électrostatiques est principalement basée sur les variations de pH. Tout d'abord, les charges globales des polymères qui entourent les nanoparticules peuvent varier en fonction de ce paramètre. Cette approche a été appliquée avec succès à la mitoxantrone. A pH physiologique, les charges positives du médicament interagissent avec les charges négatives des phosphates portés par le polymère glucidique. Le pH acide rencontré par le complexe dans les compartiments intracellulaires permet la désorption du médicament. Cette formulation a entraîné la rémission partielle ou totale de tumeurs implantées chez des lapins [223] et des rats [224]. D'autre part, les anthracyclines possèdent la particularité de

pourvoir chélater les ions ferriques de façon dépendante du pH [225]. Cette capacité a été utilisée pour la complexation de doxorubicine sur des nanoparticules d'oxyde de fer [226]. Ce type de complexe a permis de réduire de 63% le volume de tumeurs implantées chez la souris, contre 38% pour la dose maximale de doxorubicine seule (5 mg/kg, soit 8 fois supérieure à la dose chargée sur les nanoparticules), qui s'est accompagnée d'effets secondaires toxiques aigus pour la souris [227]. Les liaisons hydrazones aboutissent au même phénomène car elles sont détruites à pH acide. A pH physiologique, la quantité de doxorubicine libérée pendant 3 jours est négligeable, alors qu'à pH acide 30-60% du principe actif a été libéré en une dizaine d'heures [213, 228]. L'accumulation de la doxorubicine dans des cellules de gliome de rat résistantes à ce traitement confirme que la conjugaison avec des nanoparticules permet au médicament d'éviter l'efflux en dehors des cellules. Ce phénomène s'est accompagné d'une réduction de la viabilité cellulaire [229].

Les agents chimiothérapeutiques peuvent également être immobilisés sur les nanoparticules d'oxyde de fer grâce à des liaisons covalentes. C'est le cas du méthotrexate, qui a été couplé aux fonctions amines de l'enrobage de PEG. Cette formulation a montré une libération prolongée du principe actif dans des cellules de gliomes, et une toxicité supérieure à celle la molécule seule [230]. La libération du médicament peut également être favorisée en utilisant une séquence reconnue par les enzymes intracellulaires. La séquence tétra-peptidique Gly-Phe-Leu-Gly est clivée par la cathepsine B, qui est une enzyme lysosomiale. Plusieurs études ont rapporté la libération efficace *in vitro* et *in vivo* de différents médicaments couplés à des polymères par ce térapeptide, ainsi qu'une diminution des effets secondaires toxiques associés à l'administration de l'agent chimiothérapeutique seul [231-235]. L'utilisation de liaisons esters, qui sont reconnues par les estérases, a permis la libération efficace du 5-fluorouracile [236] et de la camptothécine [237], qui s'est accompagnée d'effets cytotoxiques.

Par ailleurs, les propriétés de certains enrobages sont exploitées pour la conjugaison de quantités importantes de médicaments. C'est le cas notamment de l'enrobage de silice, dont la porosité permet d'encapsuler de façon efficace de fortes concentrations de principes actifs [238]. Les nanoparticules peuvent également être enrobées d'acide oléique, un acide gras qui permet la conjugaison de médicaments, dans lequel sont ancrés des poloxamères (Pluronic) pour favoriser la dispersion de la formulation. Cette formulation a permis un fort chargement en doxorubicine (74-95%), dont la libération prolongée (2 semaines) a induit des effets anti-prolifératifs sur des cellules du cancer du sein MCF-7 [233, 234].

Les nanoparticules magnétiques et les médicaments peuvent également être encapsulés en grande quantité dans des « nanocapsules », composées de structures polymériques,

liposomales ou micellaires. Ces « nanocapsules » permettent la séquestration et la protection des médicaments contre la dégradation par l'organisme avant la délivrance aux cellules ciblées. Une nanostructure composée de polymère organique PECA (Poly(ethyl-2-cyanoacrylate)) et d'une taille finale de 250 nm a permis la libération prolongée du cisplatine [239]. Dans le cas de structure à base de lipides, il existe cependant un risque d'agrégation de ces enrobages pouvant entraîner une perte des propriétés physicochimiques et magnétiques des nanoparticules [207].

Enfin, afin de contrôler de façon précise la libération du principe actif, il est possible d'appliquer un champ magnétique oscillatoire, qui provoque l'oscillation des nanoparticules et la libération du médicament dans ces conditions de stress mécanique [240]. Une autre stratégie consiste à tirer avantage de la capacité des nanoparticules à chauffer dans un champ magnétique alternatif, ce phénomène est appelé hyperthermie.

B.2.2. Hyperthermie

L'hyperthermie peut être utilisée en combinaison avec les thérapies anti-cancéreuses conventionnelles, car elle permet de sensibiliser les tumeurs aux traitements par radiothérapie ou chimiothérapie [241]. En fonction de la température, il existe plusieurs types de traitements thermiques. L'ablation thermique, qui s'effectue entre 46°C et 56°C, aboutit à la destruction de la tumeur par la nécrose ou la carbonisation du tissu. Cependant, le risque de surchauffer les tissus sains environnants implique un contrôle très précis de la température, ce qui est actuellement difficilement réalisable. La diathermie utilise des températures faibles (inférieures à 41°C) pour le traitement des maladies rhumatoïdes en physiothérapie. Enfin, l'hyperthermie est basée sur la sensibilité accrue des cellules tumorales à des températures située entre 42°C et 46°C par rapport aux cellules normales. De plus, les cellules hypoxiques sont plus sensibles à la chaleur que les cellules bien oxygénées. Lors de l'hyperthermie les cellules subissent un stress induit par la chaleur qui aboutit à l'inactivation de fonctions cellulaires, liée notamment à la dénaturation et l'agrégation des protéines, et l'expression de protéines Hsp (heat shock protein) et de protéines MDR. Ces phénomènes sont responsables de l'induction de l'apoptose [205, 242, 243].

Les nanoparticules magnétiques sont capables de transformer l'énergie électromagnétique en chaleur lorsqu'elles sont exposées à un champ magnétique alternatif. L'origine de l'échauffement des particules magnétiques dépend essentiellement de leur taille,

et donc de leurs propriétés magnétiques. Pour les particules les plus larges (c'est-à-dire les matériaux multi-domaines ferro- ou ferrimagnétiques), la chaleur est due à la perte par hystérésis. En effet, l'énergie absorbée par la nanoparticule n'est que partiellement restituée lorsque le champ est retiré. Une partie de cette énergie est dissipée sous forme calorifique : le matériau s'échauffe. Pour les nanoparticules à simple domaine, c'est-à-dire les nanoparticules superparamagnétiques, l'énergie magnétique se dissipe lorsque le moment magnétique retourne à son état d'équilibre (relaxation de Néel). Pour les deux catégories de nanoparticules, l'échauffement peut également provenir de la relaxation Brownienne, qui correspond à la rotation physique de la nanoparticule magnétique, dont la friction avec le milieu environnant génère de la chaleur [199, 238].

Dans les compartiments intracellulaires, tels que les endosomes, le mouvement des nanoparticules dans un champ magnétique alternatif peut être gêné par leur environnement. La relaxation de Néel est donc généralement la principale contribution à la génération de chaleur [243].

L'efficacité hyperthermique d'une particule est définie par le SAR (specific absorption rate). La valeur du SAR dépend de nombreux facteurs, tels que la taille, la forme, la structure du cœur, les propriétés magnétiques, la composition chimique de la surface, la fréquence et l'amplitude du champ magnétique appliqué et la viscosité du milieu environnant [199, 239]. Elle varie de quelques dizaines à quelques centaines de Watt par gramme de matériel magnétique. Ces données sont critiques pour une utilisation clinique, car plus le SAR est élevé, plus la dose injectée sera faible.

La première utilisation biomédicale de particules magnétiques pour l'hyperthermie anti-tumorale date de 1957, lorsque Gilchrist et ses collaborateurs ont induit l'échauffement de particules micrométriques d'oxyde de fer Fe_2O_3 injectées chez le chien au niveau de métastases localisées dans les ganglions lymphatiques [244]. Cette étude a ouvert la voie à de nombreuses années de travaux de recherche, à la fois *in vitro*, *in vivo* chez l'animal, et à des études cliniques chez l'homme.

In vitro, le traitement par hyperthermie provoque une baisse de la viabilité importante (70-85%) pour de nombreux modèles cellulaires chargés en nanoparticules d'oxyde de fer, essentiellement suite à l'induction de l'apoptose [239, 241]. L'effet anti-tumoral de ces nanoparticules soumises à un champ magnétique alternatif a été confirmé *in vivo* [242, 243].

D'autre part, comme cela a été évoqué dans la section précédente, l'application d'un champ magnétique alternatif permet de libérer la totalité de l'agent chimiothérapeutique couplé aux nanoparticules d'oxyde de fer. Une étude a montré l'effet synergique de la

combinaison de l'effet cytotoxique (76%) de l'hyperthermie et du cisplatine conjugué à des nanoparticules magnétiques, contre 23% pour le cisplatine seul et 15% pour le traitement d'hyperthermie en absence de la molécule cytotoxique [245]. Pour obtenir la libération contrôlée du principe actif, il existe deux mécanismes distincts. Tout d'abord le médicament peut être lié à la nanoparticule à l'aide d'un agent de pontage labile sensible à la chaleur. En présence de champ magnétique alternatif, 35% du principe actif a été libéré par diffusion en 20 minutes, et la température de la solution a atteint 50°C [246]. Deuxièmement, les nanoparticules magnétiques et le médicament peuvent être encapsulés dans des liposomes, dont la structure est sensible à l'augmentation de la chaleur [247]. Plusieurs études basées sur l'utilisation de cœurs magnétiques encapsulés dans des liposomes cationiques ont été menées chez l'animal [247, 248]. La régression de tumeurs a également été obtenue chez des souris traitées avec des magnétoliposomes vectorisés avec l'anticorps Herceptine[®], grâce à l'effet combiné de l'hyperthermie et de l'activité thérapeutique de l'anticorps qui exerce une action bloquante sur le récepteur oncogénique HER2 [248].

Actuellement, seule l'équipe de Dr Jordan à Berlin a atteint l'étape des essais cliniques chez l'homme en matière d'hyperthermie. Ils ont développé à la fois un appareil unique permettant d'appliquer un champ magnétique alternatif à l'ensemble du corps humain (MFH 300F[®] (MagForce Nanotechnologies AG, Berlin, Allemagne) (Figure 14) et des nanoparticules magnétiques biocompatibles (Nanotherm[®]). Le premier rapport d'une application clinique concerne un patient âgé de 67 ans atteint d'un carcinome de la prostate. Les nanoparticules ont été injectées directement dans la tumeur. Leur rétention prolongée dans la prostate a permis des traitements d'hyperthermie répétés pendant 6 semaines. Cette étude a montré pour la première fois en 2005 la faisabilité de ce type de traitement chez l'homme, puisque des températures suffisamment élevées ont été atteintes dans la prostate (40°C à 48,5°C) [249]. Ces résultats encourageants ont été confirmés par un essai clinique de phase I mené chez 10 patients atteints de cancer de la prostate avec récurrences. De plus, des dépôts de nanoparticules ont été détectés dans la prostate un an après leur injection transpéritonéale. Aucune toxicité systémique n'a été observée chez les patients sur une médiane de 17 mois et demi [250]. Un essai clinique similaire a été réalisé chez 14 patients atteints de glioblastome multiforme. Après avoir reçu une injection intra-tumorale de fluide magnétique, les patients ont subi en moyenne 6 sessions de thermothérapie en combinaison avec de la radiothérapie externe. L'association de l'hyperthermie a permis de diminuer la dose de radiothérapie nécessaire. Dans 90% du volume de la tumeur, la température a atteint une

température de 39.3°C à 45.5°C, en l'absence d'effets secondaires. Des signes de contrôle tumoral ont pu être observés localement [251].

Malgré des résultats prometteurs, l'application clinique de l'hyperthermie n'a pas encore aboutie en tant que traitement conventionnel. Cela est principalement dû aux limitations des techniques actuelles, telles que l'adressage spécifique à la tumeur et la répartition homogène de la chaleur au sein du tissu tumoral [252]. De plus, il est nécessaire de normaliser la production d'appareils permettant les applications cliniques chez l'homme, car actuellement l'équipe du Dr Jordan détient l'unique prototype au monde.



Figure 14: Appareil permettant l'application d'un traitement hyperthermique chez l'homme.

Traitement hyperthermique pelvien après injection de nanoparticules magnétiques grâce à l'appareil générateur de champ magnétique alternatif MFH 300F[®] [252].

B.3. Biodistribution des nanoparticules et influence de leurs caractéristiques physico-chimiques

B.3.1. Adressage passif

La biodistribution des nanoparticules dépend de leurs propriétés physico-chimiques, telles que leur taille, leur forme et leurs caractéristiques de surface. Ces paramètres vont influencer l'interaction des nanoparticules avec les cellules et affecter leur demi-vie plasmatique [168, 253].

B.3.1.1. Système réticulo-endothélial (RES)

B.3.1.1.a. Définition

La biodistribution des nanoparticules est affectée par toute une série de facteurs, incluant le mode d'administration, les propriétés des nanoparticules et l'environnement physiologique dans lequel elles sont introduites [254].

Lorsque les nanoparticules pénètrent dans la circulation sanguine, elles rencontrent immédiatement un environnement complexe de protéines plasmatiques et de cellules immunitaires [255]. La première étape de la clairance sanguine des nanoparticules est l'adsorption d'opsonines à leur surface. Les opsonines sont des protéines plasmatiques qui sont capables d'interagir avec les récepteurs membranaires des monocytes et des macrophages. Les protéines qui s'adsorbent le plus fréquemment à la surface des nanoparticules sont les immunoglobulines, les composants du système du complément, les fibrinogènes et l'albumine [255]. L'étape d'opsonisation permet la phagocytose des nanoparticules par les cellules du système réticulo-endothélial (RES). Cette phagocytose peut avoir lieu à la fois dans la circulation sanguine par les monocytes, les leucocytes et les cellules dendritiques ; et dans les tissus par les macrophages résidents (les cellules de Kupffer dans le foie, les cellules dendritiques dans les ganglions lymphatiques, les macrophages et les cellules B dans la rate). Parmi les facteurs qui affectent l'opsonisation, on trouve la taille, la densité de charges à la surface et l'équilibre hydrophobicité/hydrophilie des nanoparticules [254-256].

D'autre part, l'adsorption de protéines à la surface des nanoparticules peut augmenter leur taille globale, changer leur charge de surface ou favoriser leur agrégation, provoquant ainsi de profondes modifications de leurs propriétés physico-chimiques [254].

Lorsque les nanoparticules d'oxyde de fer sont administrées par voie intra-veineuse, leur demi-vie plasmatique chez les patients varie d'1h à 24-36h en fonction leurs propriétés physio-chimiques [206]. De plus, elle est généralement plus prolongée chez l'homme par rapport à l'animal. Par exemple, la demi-vie plasmatique de nanoparticules de 30 nm de diamètre est de 2-3h chez le rat, alors qu'elle est de 24-36h chez l'homme. Il est donc nécessaire d'administrer une dose plus importante d'agent de contraste chez l'animal (200 à 1000 $\mu\text{mol Fe/kg}$) par rapport à l'homme (45 $\mu\text{mol Fe/kg}$ en clinique) [256]. La biodistribution finale typique des nanoparticules est d'environ 80-90% dans le foie, 5-8% dans la rate, et 1-2% dans la moelle osseuse [201, 202][254]. La stratégie d'adressage passif consiste à tirer avantage de cette biodistribution pour délivrer les agents de contraste ou les médicaments aux organes du RES. Si ces organes ne correspondent pas à la cible souhaitée, la stratégie consiste alors à rendre les nanoparticules furtives (voir section B.3.1.2. Furtivité des nanoparticules) [205].

D'autre part, leur demi-vie plasmatique est dépendante de la dose administrée. Cette caractéristique, démontrée pour plusieurs systèmes de nanoparticules, est liée à la saturation progressive des macrophages [206]. *In vitro*, une étude a montré que la phagocytose des nanoparticules d'oxyde de fer impliquait l'activation des récepteurs scavengers SR-A I et II (ou récepteurs éboueurs). En effet, en présence de ligands spécifiques de ces récepteurs la phagocytose des nanoparticules par les macrophages péritonéaux de souris est inhibée [200, 257].

B.3.1.1.b. Influence de l'enrobage et de la charge de surface des nanoparticules

Afin de rendre les nanoparticules biocompatibles et biodégradables, il est nécessaire d'enrober le cœur de la nanoparticule avec des molécules polymériques. Cela permet d'empêcher la déstabilisation et l'agrégation de la suspension colloïdale, et favorise la solubilisation des nanoparticules dans les milieux aqueux et biologiques [206]. Les propriétés de ces enrobages, notamment la nature du polymère et les charges de surface, sont des paramètres qui influencent la captation et l'élimination des nanoparticules par les macrophages. Le choix du polymère va donc être conditionné en fonction de l'application médicale des nanoparticules, c'est-à-dire des organes que l'on souhaite cibler.

Pour l'adressage aux organes du RES, le polymère le plus fréquemment utilisé est le dextran. Ce sucre s'apparente aux lipopolysaccharides exprimés à la surface des bactéries, ce qui favorise sa reconnaissance par les macrophages et donc la phagocytose des nanoparticules

par les cellules immunitaires. D'autre part, les nanoparticules enrobées de sucre peuvent atteindre le cerveau après leur phagocytose par des macrophages qui vont s'infiltrer au niveau des sites d'altération de la barrière hémato-encéphalique [258].

L'utilisation massive du dextran pour l'enrobage des nanoparticules d'oxyde de fer est liée à sa biocompatibilité et à sa forte affinité pour les surfaces d'oxyde de fer. Les enrobages classiques de dextran reposant sur des interactions hydrogènes, il est susceptible de se détacher de la nanoparticule. C'est pourquoi il a été lié de façon covalente grâce à l'utilisation d'épichlorhydrine et d'ammoniaque, formant un CLIO (crosslink iron oxide) [298, 299]. Les CLIOs constituent des plateformes polyvalentes avec une demi-vie plasmatique longue et l'absence de toxicité aiguë. Cependant, l'épichlorhydrine ne se dégradant pas dans l'organisme, leur utilisation en clinique est peu probable. En alternative à l'utilisation de l'épichlorhydrine, une technique basée sur la chimie du silane a été développée pour lier le dextran de manière covalente [207].

Afin d'améliorer l'imagerie des cellules immunitaires et des organes associés, de nouveaux enrobages ont été développés. La phagocytose de nanoparticules d'oxyde de fer enrobées de silice ou de citrate s'est révélée supérieure à celle des nanoparticules enrobées de dextran [259, 260].

La charge de surface est également un facteur important pour la demi-vie plasmatique des nanoparticules d'oxyde de fer. Globalement, un enrobage neutre prolonge la demi-vie plasmatique des nanoparticules, limite la reconnaissance par le RES et leur accumulation dans le foie, contrairement aux nanoparticules chargées [255, 261]. D'autre part, une étude a montré que les nanoparticules magnétiques enrobées de dextran chargées positivement avaient une clairance plus rapide (1-2 min) que celles chargées négativement (40-50 min). Les nanoparticules cationiques ont été principalement retrouvées dans le foie et la rate, alors que celles chargées négativement ont été retrouvées dans les ganglions lymphatiques, ayant ainsi une biodistribution et une pharmacocinétique proche des nanoparticules neutres [262].

Cependant, concernant l'interaction des nanoparticules d'oxyde de fer avec les cellules, les résultats diffèrent en fonction de la charge positive ou négative. Certaines études montrent que la charge positive des nanoparticules favorise fortement leur interaction avec la membrane cellulaire car celle-ci est chargée négativement [203, 306, 307]. C'est notamment le cas de nanoparticules enrobées de polyvinyl alcool (PVA) portant différentes charges [263-265]. Néanmoins, d'autres études rapportent que les nanoparticules d'oxyde de fer anioniques seraient préférentiellement endocytées par les cellules [266-268]. Les charges négatives des

nanoparticules interagiraient avec les sites cationiques présents à la surface des cellules [312, 313]. La liaison de ces nanoparticules se ferait sous forme de cluster, à cause des répulsions avec les nombreux domaines chargés négativement [268].

Ces divergences peuvent s'expliquer par la diversité des systèmes cellulaires utilisés [269], et les différences dans la nature des polymères recouvrant les nanoparticules. Il n'est donc pas possible de généraliser les résultats obtenus pour un type de nanoparticule, c'est pourquoi une étude doit être réalisée lors du choix de la nanoparticule et de l'enrobage.

B.3.1.1.c. Influence de la taille des nanoparticules

La taille hydrodynamique d'une nanoparticule comprend le nanocrystal qui constitue le cœur de la particule, ainsi que les couches d'enrobage organiques et de molécules qui l'entourent. Ce paramètre constitue une autre caractéristique importante des nanoparticules, car la taille hydrodynamique influence non seulement les propriétés physiques, mais aussi la clairance plasmatique et le devenir des nanoparticules après leur injection dans l'organisme. En général, les nanoparticules de taille importante sont captées plus efficacement par les macrophages que des nanoparticules de petite taille possédant les mêmes propriétés de surface [255, 257, 270, 271]. En effet, dans le cas de nanoparticules possédant le même enrobage, les nanoparticules de petite taille (< 30 nm) sont moins susceptibles d'être captées par le foie que les nanoparticules dont la taille est supérieure à 50 nm (25% contre 83% de la dose injectée), et leur demi-vie plasmatique est prolongée (97 min contre 6 min respectivement) [206, 257, 272].

De manière générale, lorsque la taille des nanoparticules est inférieure à 6 nm, elles sont rapidement excrétées par les reins [273]. Entre 100 et 300 nm, elles sont massivement captées par les organes du RES. Les nanoparticules dont la taille hydrodynamique est située entre 10 et 100 nm ont une demi-vie plasmatique prolongée, car elles sont suffisamment petites pour échapper à la phagocytose par le RES et pour diffuser à travers les capillaires sanguins vers les tissus [207]. Les nanoparticules d'oxyde de fer de 50 nm s'accumulent préférentiellement dans les ganglions lymphatiques [257, 274, 275].

En conclusion, plus la particule est petite, neutre et hydrophile, plus sa demi-vie plasmatique sera importante [205]. Il existe également des polymères qui favorisent la furtivité des nanoparticules vis à vis du RES.

B.3.1.2. Furtivité des nanoparticules

L'approche la plus commune pour empêcher la reconnaissance des nanoparticules par le RES consiste à limiter l'adsorption des opsonines à leur surface. Pour cela, plusieurs polymères d'enrobage ont été testés, tels que le polyéthylène glycol (PEG), le poloxamère ou la polyxamine. Le polymère le plus utilisé dans les formulations pour les applications médicales est le PEG, pour ses propriétés de furtivité vis-à-vis du RES et sa très bonne biocompatibilité. Le PEG est un polyéther synthétique linéaire, neutre et hydrophile, ce qui prolonge la demi-vie des nanoparticules dans la circulation sanguine et diminue considérablement la captation par les phagocytes résidents du foie et de la rate [168, 205, 207, 255, 276, 277]. En effet, en créant un champ de répulsion stérique autour de la nanoparticule, le PEG empêche l'adsorption des opsonines [255, 278]. Des études ont montré que son efficacité dépendait de son poids moléculaire, les conditions optimales étant obtenues lorsque celui-ci varie de 2000 à 5000 g/mol [205, 278].

Les caractéristiques de furtivité du PEG limitent son utilisation pour l'imagerie des macrophages et des cellules associées, mais en fait un outil théoriquement adapté pour le ciblage spécifique de cellules après l'ajout de ligands [207] (voir section B.3.2. Adressage actif grâce à la vectorisation des nanoparticules).

B.3.1.3. Effet EPR (Enhanced Permeability and Retention)

Lors de l'angiogenèse tumorale, la vascularisation est perturbée, et les capillaires discontinus présentent des pores dont la taille peut atteindre 600 nm. La fenestration de l'endothélium permet l'extravasation des nanoparticules qui vont s'accumuler dans l'espace interstitiel. Ce phénomène est appelé effet EPR, pour « enhanced permeability and retention effect » [168, 204]. L'accumulation des nanoparticules dans les tumeurs est également favorisée par l'absence de système de drainage lymphatique efficace [258].

L'effet EPR peut être observé dans la plupart des cancers chez l'homme, à l'exception des tumeurs hypo-vascularisées telles que le cancer de la prostate et du pancréas [279]. Si les nanoparticules sont capables d'échapper au RES, des concentrations locales de médicaments très importantes peuvent être atteintes dans la tumeur, par exemple 10-50 fois supérieures aux tissus sains en seulement un jour ou deux [280]. Les nanoparticules doivent avoir idéalement une taille comprise entre 10 et 100 nm (inférieure à 400 nm pour franchir les fenestrations, supérieure à 10 nm pour ne pas être excrétées par les reins, et inférieure à 100 nm pour ne pas

être captées par le foie). Cependant, l'adressage passif des nanoparticules grâce à l'effet EPR présente des limitations car il dépend du degré de vascularisation de la tumeur [281].

Bien que plusieurs études rapportent une accumulation passive de particules injectées en intraveineuse dans des tumeurs solides, l'efficacité de l'adressage varie d'une étude à l'autre. Ces différences peuvent être expliquées par l'hétérogénéité de la vascularisation et de la porosité des vaisseaux sanguins dans les tumeurs.

B.3.1.4. Ciblage par aimantation

Les nanoparticules magnétiques chargées en médicaments peuvent être concentrées au niveau du site d'intérêt grâce à un champ magnétique externe à fort gradient appliqué au niveau de la tumeur. Cette technique a permis d'accumuler efficacement des nanoparticules d'oxyde de fer dans la tumeur chez le lapin et le rat. La libération de mitoxantrone associée aux nanoparticules a entraîné une régression tumorale, contrairement au groupe contrôle en absence de champ magnétique [223, 224].

L'aimantation permet de concentrer massivement les nanoparticules magnétiques dans les tumeurs. De plus, cette approche permet de s'affranchir de l'étape de vectorisation, il n'est donc pas nécessaire d'avoir identifié une cible pharmacologique surexprimée dans le tissu. Néanmoins les principaux inconvénients de cette technique sont l'agrégation des nanoparticules, le risque d'embolisation, et les applications limitées à des sites peu profonds [205, 274].

B.3.2. Adressage actif grâce à la vectorisation des nanoparticules

B.3.2.1. Définition de la vectorisation des nanoparticules

Les avancées récentes en biologie cellulaire ont contribué à une meilleure compréhension des mécanismes d'adressage des médicaments au niveau cellulaire et subcellulaire. Les cellules cancéreuses présentent souvent un profil d'expression protéique différent de celui de cellules saines dont elles découlent. Certaines protéines surexprimées dans les tissus cancéreux, en particulier les récepteurs membranaires (voir section Chapitre I : F/ Surexpression de récepteurs couplés aux protéines G dans les tumeurs : Cibles diagnostiques et thérapeutiques), constituent des cibles intéressantes pour le diagnostic et la thérapie de ces pathologies.

La vectorisation consiste à conjuguer à la surface des nanoparticules des ligands capables de se lier de façon spécifique à des épitopes de surface ou à des récepteurs. Cette approche permet de cibler les cellules cancéreuses, même lorsque celles-ci sont disséminées sous forme de métastases. Ces ligands peuvent être des oligosaccharides, des peptides, des aptamères ou des anticorps, dont la conjugaison aux nanoparticules se fait par couplage chimique avec l'enrobage fonctionnalisé [282].

Les anticorps monoclonaux ont constitué la catégorie préférentielle des molécules de ciblage ces dernières décennies, depuis que Warenius a décrit pour la première fois en 1981 leur capacité à cibler directement les cellules tumorales [283]. Depuis, de nombreux anticorps anti-cancéreux ont été approuvés par les autorités de santé pour des applications cliniques. L'Herceptine[®] (trastuzumab) est un anticorps dirigé contre le récepteur HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2) surexprimé dans les cancers du sein, des ovaires et du poumon qui a été approuvé en 1998. D'autres anticorps ont été approuvés pour leur utilisation en traitement clinique, tels que l'Erbitux[®] (cetuximab), un inhibiteur du récepteur de l'EGF utilisé dans le cancer colorectal ; le Rituxan[®] (rituximab), qui cible les cellules B positives pour l'antigène CD20 dans le traitement de lymphomes non Hodgkinien ; et l'Avastin[®] (bevacizumab), qui cible le VEGF dans les cancers du colon, du sein, et du poumon non à petites cellules [168, 281]. Initialement utilisés en tant que thérapie indépendante, la combinaison de ces anticorps avec des molécules cytotoxiques a montré des effets thérapeutiques synergiques, comme c'est le cas pour l'Herceptine[®] associé au paclitaxel et à la doxorubicine [284]. Cependant, cette technique est limitée par la faible quantité d'agents chimiothérapeutiques délivrés à la tumeur (3-10 molécules par anticorps). De plus, ils ont une faible pénétration tumorale du fait de leur taille importante et peuvent être phagocytés par les macrophages, c'est pourquoi en général seul un fragment de l'anticorps est couplé à la nanoparticule [285]. La tendance est actuellement au choix de peptides pour la vectorisation des nanoparticules, car ils sont relativement plus stables que les anticorps, et ils ont moins tendance à être immunogènes [282].

Les nanoparticules « transporteurs de médicaments » ont été développées afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique des principes actifs. Une étude réalisée sur plusieurs modèles animaux a montré que des liposomes chargés avec de la doxorubicine et vectorisés avec l'Herceptine[®] étaient plus efficaces que l'agent chimiothérapeutique seul, que l'anticorps seul, ou que la doxorubicine encapsulée dans des liposomes non vectorisés [163].

De façon surprenante, plusieurs études ont montré que la quantité de nanoparticules accumulées dans la tumeur n'était pas toujours supérieure lorsque les nanoparticules étaient vectorisées. En effet, l'accumulation tumorale des nanoparticules étant liée à l'effet EPR, le ligand ne joue aucun rôle lors de leur extravasation des capillaires. Par contre, la différence apparaît au niveau de l'efficacité du traitement, en effet le pouvoir anti-cancéreux du principe actif est nettement amélioré grâce à l'internalisation et la libération du médicament dans les cellules cancéreuses [221]. Or la vectorisation des nanoparticules augmente fortement leur internalisation dans les cellules, puisqu'elle est dépendante de l'activation du récepteur ciblé par le ligand conjugué à la nanoparticule [281].

Ce phénomène lié à l'extravasation des nanoparticules ne concerne pas le ciblage des protéines des cellules endothéliales tumorales. En effet, de nombreuses études rapportent l'efficacité de la vectorisation de nanoparticules avec le VEGF ou le peptide cyclique RGD, qui lie les intégrines. Plusieurs types d'intégrines sont surexprimées au niveau de la vascularisation tumorale et de nombreuses cellules cancéreuses métastatiques [149, 222, 257, 268, 273]. D'autre part, le ciblage des cellules leucémiques ne requiert pas l'extravasation des nanoparticules puisqu'elles sont présentes dans la circulation sanguine [221].

B.3.2.2. Exemples de vectorisation et applications cliniques

Les protéines les plus fréquemment ciblées sont le récepteur du folate, de la transferrine [286-288], les glycoprotéines membranaires (lectines) [289], et le récepteur de l'EGF [290]. Ces protéines présentent toutes les caractéristiques d'être surexprimées dans de nombreux cancers et sont internalisées suite à leur activation [281].

De nombreuses études ont consisté à vectoriser des nanoparticules avec l'acide folique, afin de cibler le récepteur au folate [269, 280-282]. Ce récepteur est fréquemment surexprimé dans plusieurs cancers métastatiques, tels que les cancers du sein, des ovaires et colorectaux, alors qu'il est absent des tissus sains [291]. Le récepteur au folate constitue donc un marqueur tumoral très spécifique.

A cause de la forte demande en fer des tumeurs, le récepteur de la transferrine est fortement exprimé dans un grand nombre de cancers [286]. Grâce à sa capacité à franchir les barrières cellulaires par la voie de transcytose, la transferrine s'est révélée intéressante pour l'adressage de médicaments au cerveau [292].

Les récepteurs EGFR et HER2 font partie de la famille des récepteurs à l'EGF. Leur surexpression dans un grand nombre de cancers est liée à une baisse de leur désensibilisation.

La diminution de leur internalisation est souvent causée par l'apparition de mutations, qui ont des effets oncogéniques. C'est pourquoi des anticorps capables de forcer l'internalisation de ces récepteurs ont été développés (Herceptine et Erbitux) [293].

D'autre part, le récepteur de l'hormone LHRH (luteinizing hormone releasing hormones) est un autre exemple de RCPG surexprimé dans les cancers, avec une forte incidence dans le cancer du sein (60%) [294]. La vectorisation de nanoparticules d'oxyde de fer avec la LHRH a permis de cibler efficacement la tumeur (59% contre 9% pour les nanoparticules non vectorisées), et a fortement diminué la quantité de nanoparticules dans le foie (5% contre 55%). De plus, les nanoparticules vectorisées ont ciblé les métastases pulmonaires (20% contre 2%) [295, 296].

Il existe de nombreuses autres études rapportant la vectorisation de nanoparticules d'oxyde de fer, relatées dans les revues suivantes : [205, 274, 297, 298].

D'autre part, certains RCPG que l'on retrouve surexprimés dans les tumeurs neuroendocrines (voir section F.1. Récepteurs couplés aux protéines G surexprimés dans les tumeurs neuroendocrines et les GIST) ont également fait l'objet d'un ciblage par des nanoparticules vectorisées. Par exemple, des analogues de somatostatine ont été conjugués avec succès à des nanoparticules d'or [299], d'oxyde de fer [300] ou encore des liposomes [301] pour cibler *in vitro* et *in vivo* des cellules tumorales. De plus, des nanoparticules d'or vectorisées avec la bombésine ont ciblé efficacement chez la souris une tumeur de la prostate qui surexprime le récepteur GRP [302].

B.3.2.3. Paramètres de la vectorisation influençant l'accumulation intracellulaire

La vectorisation permet d'augmenter l'accumulation intracellulaire des nanoparticules de façon spécifique. C'est le cas notamment du peptide cRGD, qui a augmenté de 90% l'internalisation de nanoparticules d'oxyde de fer dans des cellules humaines de glioblastome-astrocytome (U87MG). Cela a permis d'améliorer de 20% l'effet cytotoxique de la doxorubicine conjuguée à ces nanoparticules [222].

Plusieurs paramètres peuvent influencer l'accumulation des nanoparticules dans les cellules. Des exemples de vectorisation visant à optimiser la concentration des nanoparticules dans les tissus cibles sont évoqués ci-dessous.

Une étude rapporte que la demi-vie plasmatique du peptide RGD a été allongée de 13 à 180 minutes suite à son couplage à des nanoparticules d'oxyde de fer. De plus, le peptide conjugué aux nanoparticules (20 peptides / nanoparticule) est actif à des concentrations plus faibles que le peptide seul. Les auteurs appellent ce phénomène l'amélioration plurivalente (multivalent enhancement). Il correspond à la liaison simultanée d'un grand nombre de peptides à un grand nombre de récepteurs, ce qui multiplie les interactions de la nanoparticule avec la membrane cellulaire (Figure 15) et potentialise les effets biologiques liés à l'activation du récepteur intégrine [303].

D'autre part, une étude a montré que l'efficacité de l'accumulation intracellulaire de nanoparticules d'oxyde de fer vectorisées avec la transferrine pouvait dépendre de la nature de la liaison chimique entre le peptide et la nanoparticule. Des nanoparticules enrobées de dextran lié de façon covalente (CLIO) et fonctionnalisées avec des groupes amines a permis deux types de liaison avec la transferrine: l'une impliquant un pont disulfure et l'autre impliquant un thioéther pour une liaison covalente plus stable. Les 2 conjugués montrent des affinités similaires, mais l'internalisation est bien plus importante avec la liaison la plus stable. Cela peut s'expliquer par le fait que la transferrine peut être libérée du conjugué le moins stable avant leur interaction avec les cellules, suite au clivage du pont disulfure à la surface des cellules, plutôt que dans les endosomes. Ces données ont été confirmées en présence de milieu de culture conditionné par des cellules [304]. La nature de la liaison permettant la vectorisation est donc également un facteur important dans la distribution cellulaire de la nanoparticule.

Par ailleurs, dans certains cas, la faible sensibilité de la détection par IRM liée à une faible densité de récepteurs peut être améliorée en augmentant l'expression membranaire du récepteur avant l'administration de l'agent de contraste. L'expression du récepteur de la transferrine peut être augmentée grâce à un pré-traitement avec des chélateurs de fer, qui diminuent la quantité de fer libre, entraînant ainsi la synthèse du récepteur de la transferrine. Cette stratégie a permis d'améliorer le signal magnétique de 57% [305].

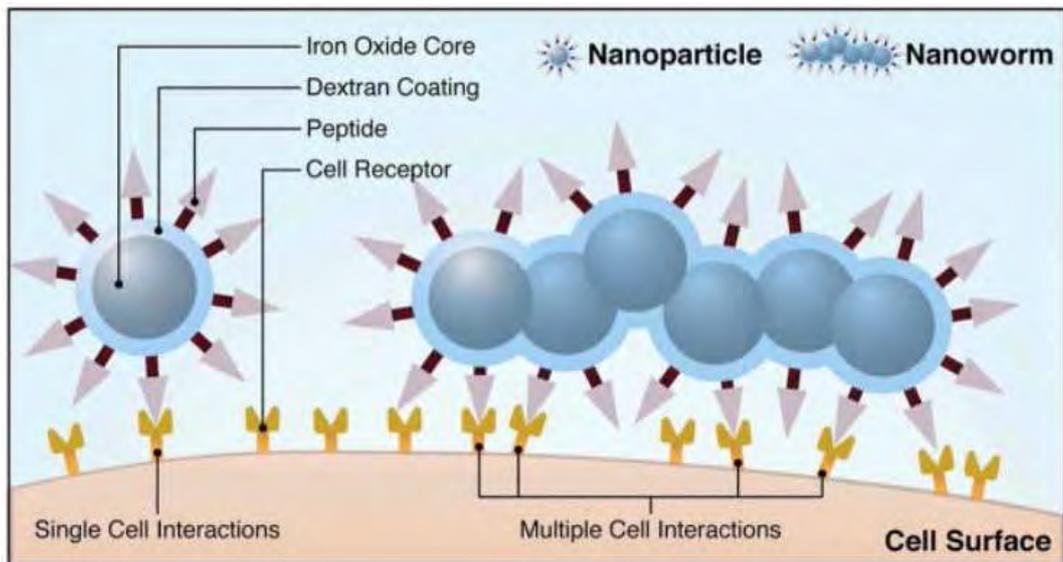


Figure 15: Représentation schématique de l'interaction multiple des nanoparticules vectorisées avec les récepteurs membranaires [207].

B.4. Localisation intracellulaire des nanoparticules

La majorité des mécanismes décrits pour l'internalisation des nanoparticules d'oxyde de fer rapporte l'implication de la voie dépendante de la clathrine [306-310], et l'adressage des nanoparticules aux lysosomes [308, 309, 311-314]. C'est le cas notamment de nanoparticules enrobées de dextran [310, 311, 314], de silice [309], de PEI [307], de PEG [313], ou encore d'une bi-couche phospholipidique cationique (magnétoliposome) [306]. Cependant, la plupart des travaux concernant l'internalisation de nanoparticules d'oxyde de fer se contente de mentionner une localisation endosomale.

Le compartiment cellulaire dans lequel le médicament est libéré peut influencer l'efficacité du principe actif. Plusieurs études rapportent que la doxorubicine est capable de sortir des lysosomes pour se concentrer dans le noyau, alors que les nanoparticules auxquelles elle était associée restent dans les lysosomes [229, 313, 315]. Néanmoins, dans la plupart des cas la séquestration des principes actifs dans les lysosomes peut entraîner leur dégradation ou les empêcher d'atteindre le cytoplasme. Pour contourner les lysosomes, les nanoparticules peuvent être conçues pour faire éclater les endosomes. C'est le cas de certaines nanoparticules qui possèdent des groupes cationiques à leur surface, qui induisent la lyse osmotique suite à l'acidification des endosomes [316]. Une autre stratégie consiste à adapter la chimie de surface afin de modifier la voie d'entrée des nanoparticules. L'endocytose par la voie dépendante de la cavéoline peut être déclenchée par des nanoparticules vectorisées avec de l'acide folique, du cholestérol ou de l'albumine [317]. En effet, la localisation intracellulaire des nanoparticules dépend fortement de la présence ou non d'un ligand de vectorisation, le choix de ce ligand étant primordial [221, 317].

Par ailleurs la façon dont les éléments sont complexés à la surface des nanoparticules constitue également un élément important dans leur destination intracellulaire. Une étude rapporte que des nanoparticules enrobées de PEI et complexées avec de l'ADN sont endocytées par la voie dépendante de la clathrine. Lorsque l'ADN est présent à la surface de l'enrobage, le complexe est adressé aux lysosomes, alors que lorsque l'ADN est protégé par le PEI, l'acide nucléique est localisé dans le noyau [307]. En effet, les nanoparticules chargées négativement (à cause des charges négatives de l'ADN) ne sont pas capables de modifier le pH des lysosomes, contrairement au PEI. En effet, les polymères cationiques sont capables de tamponner le pH acide des lysosomes grâce à la protonation des amines, ce qui induit la

déstabilisation de la membrane lysosomiale et permet la fuite des nanoparticules dans le cytoplasme [318]. La libération de l'ADN n'a pas lieu pendant la phase d'internalisation, mais dans la région péri-nucléaire. De plus, la viabilité cellulaire est affectée de manière dose dépendante lorsque les nanoparticules sont capables de sortir des lysosomes [307]. Cela pourrait être lié à la libération d'enzymes lysosomiales dans le cytoplasme.

Un autre moyen pour cibler l'adressage des nanoparticules à organites intracellulaires consiste à rajouter des signaux d'adressage spécifiques, tels que les séquences de localisation nucléaire (NLS) ou mitochondriale (MTS) [221, 319]. La présence d'une séquence NLS sur des nanoparticules d'oxyde de fer a permis une accumulation dans le noyau supérieure de 233% par rapport aux nanoparticules dépourvues de cette séquence, qui restent localisées dans le cytoplasme [320].

B.5. Métabolisme et toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer

B.5.1. Métabolisme

De façon générale, les nanoparticules d'oxyde de fer sont métabolisées dans les lysosomes et deviennent partie intégrante du pool ferrique normal de la cellule. Une fois libéré, le fer issu du cœur des nanoparticules peut se lier à différentes protéines impliquées dans le transport et le stockage du fer (la ferritine, la transferrine, l'hémoglobine et l'hémosidérine) [205, 254].

La dégradation des nanoparticules a été déterminée chez le rat grâce à un double marquage radioactif : l'enrobage de dextran a été marqué au ^{14}C et les nanoparticules au ^{59}Fe . Le dextran subit une dégradation progressive par les dextranases intracellulaires après leur captation par les macrophages, et est pratiquement exclusivement éliminé dans les urines (89% en 56 jours). Le fer contenu dans les nanoparticules est incorporé dans le pool ferrique de l'organisme et est progressivement retrouvé dans les globules rouges (hémoglobines). De même que le fer endogène il est éliminé très lentement, seulement 16-21% sont retrouvés dans les selles au bout de 84 jours [321]. La demi-vie du ^{59}Fe est de 3 jours dans le foie et 4 jours dans la rate, mais la clairance générale de l'organisme est plus longue (45 jours). La baisse du signal magnétique T2 étant plus rapide que la clairance générale, cela confirme le métabolisme des nanoparticules sous forme ionique [217].

La composition chimique mais aussi la taille et la chimie de surface doivent être considérées comme des facteurs importants dans la biodégradation des nanoparticules d'oxyde de fer. En effet, des études sur des nanoparticules de ferumoxtran, ferumoxyde, ferumoxytol ou feruglucose ont montré des profils de dégradation variant de 3 à 50 jours en fonction des enrobages [322, 323].

Bien que la dose clinique de fer injectée (environ 1 mg Fe/kg) soit faible en comparaison de la quantité totale de fer stockée dans l'organisme (environ 3500 mg), l'administration de l'agent de contraste peut perturber l'homéostasie du fer finement régulée.

B.5.2. Toxicité

En général, les nanoparticules d'oxyde de fer montrent une bonne biocompatibilité, et leur captation par les macrophages n'est pas associée avec une activation de ces cellules immunitaires. C'est le cas notamment de nanoparticules d'oxyde de fer enrobées de dextran, de poly(L-lactide), de PEG, de silice, de lipide cationique ou de PVA fonctionnalisés avec des charges positives, négatives ou neutres qui n'ont eu aucun impact sur la viabilité cellulaire, la différenciation, prolifération, adhésion et le phénotype de plusieurs types cellulaires [264, 276, 309, 324, 325].

De nombreuses études *in vivo* rapportent que les nanoparticules d'oxyde de fer n'induisent pas de toxicité, même à des doses importantes [323, 326]. Par exemple, des souris traitées pendant 4 semaines avec des nanoparticules enrobées de silice injectées en intrapéritonéale, ou alors soumises à des inhalations de nanoparticules n'ont montré aucun signe visible de toxicité [327, 328]. D'autre part, l'injection en intraveineuse des nanoparticules Feridex[®], enrobées de dextran neutre, à une dose 150 fois supérieure à celle utilisée en clinique pour l'imagerie du foie (30 mg Fe/kg) n'a induit aucune toxicité chez le rat ou le chien [217]. De plus, l'analyse histologique du foie, de la rate et des reins de rats 24h et 7 jours après l'injection de nanoparticules n'a révélée aucun changement apparent [253].

De manière générale, les nanoparticules magnétiques sont considérées comme étant non toxiques ou moins toxiques que les autres nanoparticules composées de métaux lourds [329]. Cependant, un nombre croissant de données rapporte une toxicité potentielle. Bien que la dose de nanoparticules magnétiques injectée corresponde à 1,25-5% du pool de fer total de

l'organisme, cette surcharge en fer peut entraîner des effets toxiques, notamment par la génération de radicaux oxygénés [210, 330, 331].

Plusieurs études ont montré que le facteur prédominant dans la cytotoxicité des nanoparticules d'oxyde de fer était la concentration utilisée [332]. En effet les nanoparticules d'oxyde de fer ne sont pas toxiques en dessous de 100 µg/mL. Au-delà de cette concentration, la toxicité est principalement liée à l'enrobage de surface, l'état d'oxydation du fer dans les nanoparticules et leur interaction avec les protéines [330, 333]. Elle dépend également du système cellulaire, puisqu'une étude rapporte que les nanoparticules n'ont montré aucune toxicité sur des lignées de cellules du foie, du rein et du système nerveux central pour des concentrations allant jusqu'à 128 mg/mL, alors qu'une augmentation de l'apoptose a été observée pour les cellules mononucléaires du sang périphérique pour les doses les plus importantes [334].

Chez l'homme, des cas de douleurs dorsales et de la vasodilatation ont été rapportées suite à l'administration de Feridex (incidence 2-10%), alors que le Combidex ne produit pas ces effets [329].

Malgré son approbation pour une utilisation clinique, les nanoparticules de ferucarbotran (Resovist[®]), enrobées de carboxydextran (chargée négativement) présentent des effets toxiques lorsqu'elles sont utilisées à des doses cliniques. Notamment, après leur injection chez des souris l'activation de la caspase 3 a été détectée dans les cellules de Kupffer, dont le nombre a diminué de moitié au bout de 3 jours [335]. Une autre étude rapporte que les nanoparticules chargées ont davantage tendance à induire un effet génotoxique. Les nanoparticules cationiques pourraient entrer dans le noyau et se lier directement à l'ADN, alors que les nanoparticules anioniques traverseraient la membrane nucléaire en générant des radicaux oxygénés, notamment dans le cas d'un enrobage de citrate. Néanmoins, les effets cytotoxiques observés dans cette étude ont lieu à des concentrations nettement supérieures à celles utilisées en clinique (0.5-1 mg/mL contre 0.05-0.025 mg/mL respectivement) [332].

Afin de limiter la production de radicaux oxygénés, il est possible d'utiliser un enrobage biocompatible et rigide, tel que l'or qui permet de protéger les nanoparticules d'oxyde de fer de l'oxydation. Ce processus est relativement simple, et n'altère pas les propriétés magnétiques des nanoparticules [336, 337]. Au contraire, une étude sur l'hyperthermie rapporte que cet enrobage a augmenté de 4 à 5 fois la chaleur générée par les nanoparticules [338].

La présence d'amines non protégées à la surface des nanoparticules, notamment sur les enrobages dendrimériques (polyamidoamine, carbosilane, polypropylène imine, polylysine) a été associée à des phénomènes d'hémolyse dépendants de la dose. La neutralisation de ces charges a fortement diminué la toxicité hématologique [255].

En résumé, les potentialités qu'offrent les nanoparticules en tant que sondes diagnostiques, transporteurs de médicaments et agents thermo-thérapeutiques sont supérieures aux techniques conventionnelles. Notamment, les nanoparticules d'oxyde de fer sont biocompatibles et sont actuellement utilisées en clinique pour l'imagerie par IRM. De plus, leur développement pour des applications thérapeutiques fait également l'objet d'importantes recherches. De nombreuses études sur leur biodistribution, leur furtivité et leur toxicité ont permis la définition de certaines caractéristiques générales concernant la taille, la nature de l'enrobage, les charges de surface et la vectorisation. Néanmoins, l'application de ces règles n'est pas systématique, et dépend de la relevance des modèles cellulaires et animaux. C'est pourquoi un important effort de recherche reste nécessaire pour améliorer leur biocompatibilité, leur biodistribution et leur spécificité thérapeutique.

Une partie importante de mes travaux de thèse a consisté à développer les conditions permettant la vectorisation de nanoparticules magnétiques avec la gastrine. L'étude des mécanismes d'internalisation de ces nanoparticules, de leur capacité de ciblage diagnostique et de leur potentiel thérapeutique par hyperthermie est exposée dans l'article III de la partie Résultats.

*Résultats et
Discussion*

ARTICLE I

**Characterization of a novel five-transmembrane
domain cholecystokinin-2 receptor splice variant
identified in human tumors**

INTRODUCTION

L'expression du récepteur CCK2 a été détectée dans un grand nombre de cancers d'origine épithéliale et neuroendocrine [49]. Dans les cancers digestifs épithéliaux, la co-expression de la gastrine et de son récepteur dans les mêmes cellules suggère la présence d'une boucle de régulation autocrine. Ce phénomène est corrélé avec une aggravation du pronostic dans le cas du cancer de l'estomac. De plus, plusieurs modèles cellulaires et animaux ont montré que le RCCK2 exerçait une action proliférative et induisait des transformations néoplasiques [124].

Dans les tumeurs neuroendocrines, l'expression très importante du récepteur CCK2 a conduit au développement d'analogues radiomarqués de gastrine et de CCK pour la scintigraphie ciblée des carcinomes médullaires de la thyroïde [48]. Par contre, il existe peu de données concernant le rôle potentiel du RCCK2 dans ces pathologies. Quelques études rapportent que les ligands du récepteur agissent en tant que facteur de croissance sur des lignées cellulaires issues de cancers du poumon à petites cellules [339] et de carcinomes médullaires de la thyroïde [340]. De plus, l'utilisation d'un antagoniste spécifique du RCCK2 chez un modèle de rat développant des carcinoïdes de l'estomac a inhibé le phénotype hyperplasique et diminué l'apparition de microcarcinoïdes de 60% [341].

Afin de mieux comprendre le rôle du RCCK2 dans les tumeurs neuroendocrines, nous avons recherché des variants de ce récepteur dans ces tumeurs. En effet la surexpression d'une protéine dans un contexte pathologique aboutit fréquemment à l'apparition de mutations [342]. Des variants du RCCK2 ont été identifiés dans les cancers digestifs épithéliaux bien que l'expression protéique du récepteur dans ces cancers soit relativement faible. L'expression de ces variants est cantonnée aux tissus tumoraux, et leur activité biologique est modifiée, ce qui peut suggérer qu'ils exercent un rôle potentiel dans les processus de carcinogénèse [141, 147]. Notamment, un variant d'épissage qui résulte de la rétention de l'intron 4 dans la 3^e boucle intracellulaire (CCK2Ri4sv) a été décrit comme possédant une activité constitutive et une action proliférative [141]. L'ARNm de ce variant, initialement identifié dans le cancer du colon, a été faiblement détecté dans les insulinomes, les cancers du poumon à petites cellules et les GIST (tumeurs stromales gastrointestinales) [146].

Lors de travaux préliminaires visant à approfondir les connaissances dans l'expression tumorale du RCCK2, nous avons constaté que certaines tumeurs étaient positives pour la

présence de l'ARNm du récepteur, alors que les études de liaison avec un radio-ligand ne permettaient pas de détecter la protéine. Nous avons alors envisagé que ces observations pouvaient être liées à des mutations aboutissant à des protéines tronquées ou altérant le site de liaison du récepteur.

C'est pourquoi nous avons procédé au criblage de plusieurs tumeurs exprimant différentes quantités de sites de liaison pour le RCCK2, afin de détecter d'éventuels variants au niveau de l'ARNm. Cette recherche a abouti à l'identification d'un nouveau variant d'épissage, le $\Delta E2$ -CCK2R, qui est exprimé de façon concomitante avec la forme sauvage du récepteur dans plusieurs types de tissus tumoraux. Ce variant est délété de l'exon 2, ce qui entraîne la synthèse d'une protéine à 5 domaines transmembranaires théoriques. Les caractéristiques pharmacologiques du $\Delta E2$ -CCK2R ainsi que son impact sur l'expression membranaire et l'activité biologique du récepteur sauvage ont été déterminés dans des cellules COS-7.



Characterization of a novel five-transmembrane domain cholecystokinin-2 receptor splice variant identified in human tumors

Claire Sanchez^a, Chantal Escrieut^a, Pascal Clerc^a, Véronique Gigoux^a, Beatrice Waser^b, Jean Claude Reubi^{b,*}, Daniel Fourmy^{a,*}

^a Université de Toulouse 3, EA 4552 Toulouse, France

^b Institute of Pathology of the University of Berne, Division of Cell Biology and Experimental Cancer Research, Berne, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 July 2011

Received in revised form 12 October 2011

Accepted 12 October 2011

Available online 25 October 2011

Keywords:

Cholecystokinin receptor

Splice variant

Neuroendocrine tumors

Gastrointestinal stromal tumor

Leiomyosarcomas

ABSTRACT

The cholecystokinin-2 receptor (CCK2R), is expressed in cancers where it contributes to tumor progression. The CCK2R is over-expressed in a sub-set of tumors, allowing its use in tumor targeting with a radiolabel ligand. Since discrepancies between mRNA levels and CCK2R binding sites were noticed, we searched for abnormally spliced variants in tumors from various origins having been previously reported to frequently express cholecystokinin receptors, such as medullary thyroid carcinomas, gastrointestinal stromal tumors, leiomyomas and leiomyosarcomas, and gastroenteropancreatic tumors. A variant of the CCK2R coding for a putative five-transmembrane domains receptor has been cloned. This variant represented as much as 6% of CCK2R levels. Ectopic expression in COS-7 cells revealed that this variant lacks biological activity due to its sequestration in endoplasmic reticulum. When co-expressed with the CCK2R, this variant diminished membrane density of the CCK2R and CCK2R-mediated activity (phospholipase-C and ERK activation). In conclusion, a novel splice variant acting as a dominant negative on membrane density of the CCK2R may be of importance for the pathophysiology of certain tumors and for their *in vivo* CCK2R-targeting.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Peptide hormone receptors are often overexpressed in malignant human tumors (Reubi, 2003). This is both of pathophysiological and clinical importance. Firstly, peptide hormone receptor expression by tumoral cells or surrounding cells can profoundly impact the growth of the tumor and its dissemination through the body (Dorsam and Gutkind, 2007). Secondly, peptide hormone receptor expression allows for highly specific, receptor targeted tumor imaging and therapy using radiolabeled peptide hormone analogs (Reubi, 2003). The peptide receptor first identified for these purposes have been the somatostatin receptors (Gibril and Jensen, 2004). Indeed, gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors

which express somatostatin receptors in high amounts can be visualized scintigraphically with the radiolabeled somatostatin analog OctreoScan® (Gibril and Jensen, 2004). Moreover, targeted radiotherapy of tumors with radiolabeled somatostatin analogs demonstrated promising therapeutic efficiency (Kwekkeboom et al., 2005; Waldherr et al., 2002).

The cholecystokinin-2 receptor (CCK2R) is another peptide receptor that is frequently expressed in cancers (Aly et al., 2004; Dufresne et al., 2006; Reubi et al., 1997; Reubi and Waser, 1996). It is particularly expressed at high incidence and level in several cancers such as medullary thyroid carcinomas, small cell lung cancers (SCLC), gastrointestinal stromal tumors (GIST), and insulinomas (Reubi, 2001; Reubi et al., 1997; Reubi and Waser, 1996). Although the role of the CCK2R in human tumors is not established *in vivo*, the presence of CCK2R is generally recognized as providing a growth advantage to tumors where it is expressed. Indeed, data with several cancer cell lines, including pancreatic, gastric, colonic, small-cell lung cancer as well as with transgenic mice, have documented that CCK2R mediates proliferative effects of its two natural ligands, gastrin and CCK, and triggers signaling pathways similar to that of tyrosine kinase membrane receptors (Aly et al., 2004; Dufresne et al., 2006).

The existence of splice variants and mutants of G protein coupled receptor have received much interest in oncology during the

Abbreviations: CCK, cholecystokinin; ERK, extracellular signal-regulated kinase; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; NET, neuroendocrine tumor; MTC, medullary thyroid carcinoma; GIST, gastrointestinal stromal tumor; HA, hemagglutinin.

* Corresponding authors. Address: EA 4552, Inserm U1048-I2MC, 1 avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse cedex 4, France. Tel.: +33 5 61 32 30 57; fax: +33 5 61 32 24 03 (D. Fourmy); Division of Cell Biology and Experimental Cancer Research, Institute of Pathology, University of Berne, Murtenstrasse 31, P.O. Box 62, CH-3010 Berne, Switzerland (J.-C. Reubi).

E-mail addresses: reubi@pathology.unibe.ch (J.C. Reubi), Daniel.Fourmy@inserm.fr (D. Fourmy).

past few years. First, mutants of G protein coupled receptors exhibiting constitutive activity were found to be at the origin of several pathologies as for instance hyperfunctioning thyroid adenomas (Parma et al., 1993). Second, expression of splice variants and mutants at significant level together with the wild-type form of G protein coupled receptors may have a profound impact on tumor's pathophysiology but also on tumor diagnosis using receptor targeted tumor imaging with radiolabeled hormone analogs, and on therapy using antagonists targeting the receptors (Reubi, 2003).

In the course of our works aimed at measuring density of CCK2R in tumors from various origins using a radiolabeled ligand of this receptor, we were surprised to find tumors with no significant CCK2R binding sites whereas RT-PCR experiments with RNA extracts from the corresponding tumors showed presence of CCK2R transcripts (unpublished data). To explain these results, we hypothesized that in tumors which were negative for CCK2R binding, the CCK2R pre-mRNA might be abnormally spliced leading to noncoding mRNA or CCK2R defective in binding capability, as the primers used for RT-PCR were not designed to amplify full-length transcripts. Moreover, screening of tumors for the presence of CCK2R could identify CCK2R mutants or variants with potential pathophysiological features of interest. This led us to screen for expression of CCK2R variants in several tumors of various origins. This study allowed identification of a novel five transmembrane domain CCK2R splice variant which exhibited dominant negative inhibition of CCK2R density and activity at the cell surface of transfected cells.

2. Materials and methods

2.1. CCK ligands

Sulfated [Thr,Nle]-CCK9 (Moroder et al., 1981) (named CCK in our study) was conjugated with Bolton–Hunter reagent, purified, and radio-iodinated using ^{125}I -Sodium (2000 Ci/mmol) as described previously (named ^{125}I -CCK) (Fourmy et al., 1989). Alexa Fluor 647 labeled-CCK (Alexa F647-CCK) was obtained according to the procedure described recently for glucose insulinotropic polypeptide (Yaquib et al., 2010).

2.2. Tissues

Human tumor samples were obtained from surgical resection specimens, immediately frozen and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. The tissues originated either from samples investigated previously for peptide receptors collected in accordance with the required international ethical guidelines or from samples collected prospectively at the Institute of Pathology of the University of Berne in agreement with the World Medical Association Declaration of Helsinki, including informed consent and approval by the Institutional Review Board.

2.3. Isolation of CCK2R mRNA

A tumor region was cut out of the frozen tissue block with a sterile scalpel blade. Care was taken to choose an area of tumor tissue without admixed normal tissue with the help of a matching haematoxylin and eosin stained tissue section. The dissected tissue samples ($\leq 5\text{ mg}$) were disrupted and homogenized using the TissueLyser (Qiagen, Hilden, Germany). Total RNA were isolated with the RNeasy Micro Kit (Qiagen), with inclusion of a DNase I digestion step. Reverse transcription to cDNA was performed on $1\text{ }\mu\text{g}$ of total RNA with SuperScript III using random hexamers (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). PCR was performed using UTR region primers (Table 1) and 2.5 U of Pfu Turbo DNA Polymerase (Agilent Technology, Massy, France) in a $50\text{ }\mu\text{L}$ reaction volume. PCR was

carried out as follows: 5 min at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, $35\text{--}40\text{ cycles}$ (1 min at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 min at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, and 1.5 min at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$), 5 min at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4. Cloning of CCK2R cDNA

After full-length PCR amplification, DNA fragments were extracted from 1.5% agarose gel with Nucleospin Extract II kit (Macherey Nagel, Hoerdts, France), and inserted into pCR4Blunt-TOPO vector (Invitrogen) for size assessment of PCR amplicons using EcoRI restriction enzyme (Invitrogen) and for sequencing.

For biological studies, cDNA encoding the human CCK2R was inserted in pRFNeo or pEGFP-N1 vector, and the cDNA encoding human variant $\Delta\text{E2-CCK2R}$ was cloned in pcDNA5 vector. Sequences coding for Myc or HA-tag were inserted at 5'-end of cDNA encoding CCK2Rs.

2.5. $\Delta\text{E2-CCK2R}$ RNA level related to CCK2R expression

First step of nested PCR amplified total CCK2 receptors cDNA through 20 cycles as describe above, except $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ as annealing temperature. PCR products were purified with Nucleospin Extract II kit. CCK2R and $\Delta\text{E2-CCK2R}$ mRNA expression was determined by real-time qPCR, using SYBR green dye (Applied Biosystems, Framingham, MA) to allow analysis of gene expression levels. Amplification was performed using ABI-Stepone + Detection System (Applied Biosystems, Framingham, MA). Standard curves were constructed using serial dilutions of CCK2R and $\Delta\text{E2-CCK2R}$ plasmids. Expression of $\Delta\text{E2-CCK2R}$ related to CCK2R in each tissue sample was calculated using the equation: copy number of $\Delta\text{E2-CCK2R}$ /Copy number of CCK2R $\times 100$.

2.6. Determination of CCK2R binding sites by autoradiography on tissue sections

In vitro receptor autoradiography was performed as described previously (Reubi and Waser, 1996). Briefly, $20\text{ }\mu\text{m}$ -thick tissue sections mounted on glass slides were incubated with 2000 Ci/mmol of the radioligand ^{125}I -D-Tyr-Gly-[(Nle28,31)CCK-26-33] (^{125}I -CCK; Anawa, Wangen, Switzerland) either alone or in competition with 50 nM of non radioactive sulphated CCK-8 (Bachem, Bubendorf, Switzerland) or with 50 nM of non radioactive gastrin (Bachem). The slides were then exposed to a radiation-sensitive film. The density of the CCK2R-specific signal on the film was quantified in the tumor region that was later excised from the original tumor sample for PCR analysis.

2.7. Cell culture and transfections

COS-7 cells were seeded in 10 cm dishes and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 5% fetal bovine serum. Expression plasmids of wild-type or variant receptor were transfected using polyethylenimine (PEI, 1 mg/mL , pH 7.4). Plasmids were diluted into serum-free medium, and 3 volumes of PEI/ μg of DNA were added and incubated at room temperature for 25 min . After incubation, the mixture was added to the cells. Amounts of plasmids transfected were: $0.5\text{ }\mu\text{g}$ of CCK2R plasmid alone or with 2.5 (ratio 1) or $5\text{ }\mu\text{g}$ of $\Delta\text{E2-CCK2R}$ plasmid (ratio 2).

2.8. Fluorescence microscopy

Cells were transfected with the CCK2R-Myc ($2\text{ }\mu\text{g}$) or the truncated $\Delta\text{E2-CCK2R-HA}$ ($1\text{ }\mu\text{g}$) or both. After 48 h , cells were washed once with PBS, and fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min . After 2 washes with PBS, cells were permeabilized with 0.2% Triton[®] X-100 for 5 min , then incubated with Protein Block Free (Dako,

Table 1
Primers used for end-point and real-time PCR.

	Target	Primer	Sequence (5'–3')	Gene region	Amplicon size (nt)
PCR for cloning	CCK2R + CCK2AE2R	Sense primer	GACAGTCTAGAGTCGAGCTGAGTAAGGCGGCGGGC	5' UTR	1407
		Antisense primer	GATCAATCGATCCTCAACCCACGGCCCTCTAC	3' UTR	
PCR	CCK2R + CCK2AE2R	Sense primer	TTTAGATCTAGACGGCCATGGAGCTGCTAAAGCTG	Exon 1	809
		Antisense primer	GGCAGCCCGCTTGGTTTC	Exon 4	
Nested PCR	CCK2R + CCK2AE2R	Sense primer	TCTCCTCAACAGCAGCA	Exon 1	676
		Antisense primer	GTCAAAGCGAAGCCCTAA	Exon 4	
Real-time PCR	CCK2R	Sense primer	CCGGGACACGAGAATTGG	Junction exons 1/2	62
		Antisense primer	CATCAGGAAGATCACTGCGTAAA	Exon 2	
	CCK2AE2R	Sense primer	AACAGCAGCAGTGTGGCAAC	Exon 1	76
		Antisense primer	TCACAGACACCCCTCGTGTCT	Junction exons 1/3	

Carpinteria, CA, USA) at room temperature for 1 h. Cells were incubated at 4 °C overnight with anti-calnexin rabbit antibody (1/50), Alexa fluor 488 anti-Myc mouse antibody (1/50) and Alexa fluor 647 anti-HA mouse antibody (1/200, Cell Signaling Technology, Saint Quentin Yvelines, France). After 3 washes, cells were incubated at room temperature for 1 h using Alexa fluor 488 anti-rabbit IgG (Invitrogen). Slides were mounted in fluorescent mounting medium (Dako) and analyzed on a Zeiss Laser Scanning Microscope (LSM-510).

To visualize Alexa F647-CCK binding on Δ E2-CCK2R, COS-7 cells were transfected with Δ E2-CCK2R (1 μ g) or CCK2R as a control (1 μ g). After 48 h, cells were incubated with 1 μ M Alexa F647-CCK for 1 h at 37 °C and analyzed on Zeiss Laser Scanning Microscope (LSM-510).

2.9. Inositol phosphate assay

Twenty-four hours after transfection, cells were seeded on 24-well plates and incubated overnight in DMEM containing 2 μ Ci/ml myo-[2-³H]inositol (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Inositol phosphate production was determined as described previously (Marchal-Victorion et al., 2002). EC₅₀ values were calculated from dose–effect curves by nonlinear regression curve-fitting using GraphPad Prism software.

2.10. Receptor binding assays

Twenty-four hours after transfection, cells were seeded on 24-well plates and after overnight growth, transferred to polystyrene tubes. Cells were rinsed with PBS, pH 7.4, containing 0.5% BSA and then incubated for 1 h at 37 °C with a saturating concentration (1 μ M) of Alexa F647-CCK in PBS containing 0.5% BSA. Cells were washed twice with cold PBS with 0.5% BSA. Cell-associated fluorescence corresponding to maximal binding capacity was determined using a BD FACSCalibur™ flow cytometer. Binding assays using ¹²⁵I-CCK (100 pM) was also performed to determine K_d values as previously described (Marchal-Victorion et al., 2002). They were calculated from homologous ¹²⁵I-CCK competition curves using Ligand software (Kell, Cambridge, UK).

2.11. Activation of ERK

Transfected cells were incubated for various times in the presence of CCK (0.1 μ M) in DMEM. Cells were washed four times with ice-cold PBS, and lysed in 250 μ l of lysis buffer consisting of 50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, phosphatase inhibitor (1 mM Na₃VO₄) and protease inhibitors (Roche Diagnostics). After incubation at 4 °C for 15 min, the lysates were collected, solubilized for 30 min at 4 °C with gentle rocking, and centrifuged at 13,000g for 10 min at 4 °C to remove insoluble materials. Proteins (15 μ g) were then separated by SDS–PAGE. Western blot assays were performed with

anti-phospho-ERK1/2 antibody (1/1000) which accounts for activation of the ERK pathway, followed by reprobing with anti-ERK2 antibody (1/5000) to normalize equivalent amounts of proteins (Cell Signaling Technology, Saint Quentin Yvelines, France).

2.12. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the GraphPad Prism software, using the paired *t*-test and linear regression analysis. *P* value of 0.05 was considered as significant.

3. Results

3.1. PCR cloning of CCK2Rs in human tumors

To search for potential variants of the CCK2R in human tumors, we amplified full-length cDNA by RT-PCR starting with RNA preparations from 13 tumors from various origins which were either positive or negative in CCK binding assays by autoradiography. We used UTR region primers (Table 1) and pCR4Blunt-TOPO vector. Twenty cDNA clones from each tumor were sequenced. Most of the clones displayed a sequence encoding the CCK2R. Interestingly, several clones were isolated which presented sequence truncation of 252 bp in the ORF corresponding to exon 2 of the CCK2R gene (Fig. 1A and B). Expression of such truncated transcripts was confirmed by DNA sequencing of \approx 30 cDNA clones from five separate tumors ruling out possible amplification errors. Protein translation of the truncated transcripts yields a protein sequence homologous to the human CCK2R but lacking amino acids of transmembrane domains I and II, intracellular loop I and extracellular loop II. In this Δ E2-CCK2R, the N-terminal region was directly connected to the top of transmembrane domain III (Fig. 1C). Hydrophobicity analysis <http://mobyle.pasteur.fr/> predicted a five transmembrane domain protein (Fig. 1D).

3.2. Expression of Δ E2-CCK2R and CCK2R transcripts in human tumors

RT-PCR amplification using internal primers (Table 1) revealed the presence of an amplicon corresponding to Δ E2-CCK2R in the majority of tumors examined (Fig. 2A).

We then determined whether the relative amount of truncated transcript relative to intact CCK2R transcript varied according to the tumors examined. For this purpose, real-time qPCR using specific primers of each CCK2R isoform (Table 1) was carried out. As shown in Fig. 2B, the amount of Δ E2-CCK2R transcript reached 6% of intact CCK2R transcript in leiomyosarcomas or leiomyomas and 2.7% in insulinomas. On the other hand, relative levels of Δ E2-CCK2R transcript were low in GIST and several MTC and not detectable in one leiomyosarcoma.

In vitro binding of ¹²⁵I-CCK on a leiomyosarcoma, GIST and MTC and inhibition of this binding by CCK and gastrin, in agreement

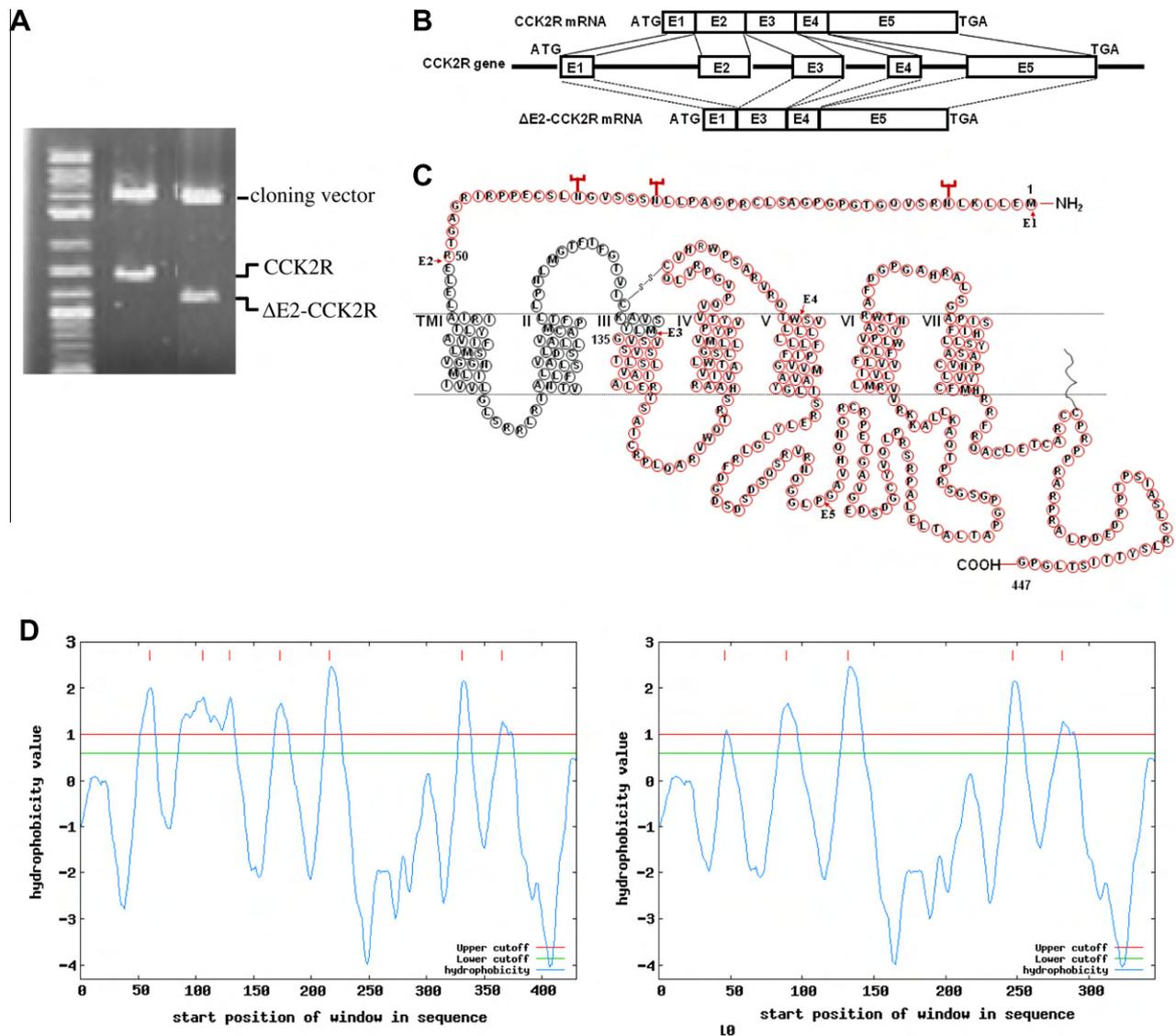


Fig. 1. Cloning and identification of $\Delta E2$ -CCK2R splice variant of CCK2R. (A) Cloning and identification of $\Delta E2$ -CCK2R, splice variant of CCK2R. RT-PCR amplification of CCK2R mRNA was performed on leiomyosarcoma tissue sample using UTR region primers. DNA fragments were inserted in cloning vector for sequencing. The upper band (1.43 kbp) encodes wild-type CCK2R isoform (full-length CCK2R). The lower band (1.18 kbp) encodes a truncated CCK2R isoform named $\Delta E2$ -CCK2R that lacks the sequence of exon 2 during RNA processing. (B) Representation of splicing generating mRNA which encodes full-length CCK2R (top) or $\Delta E2$ -CCK2R (bottom). In mRNA encoding $\Delta E2$ -CCK2R, exon 2 (E2) is lacking. (C), Serpentine representation of full-length CCK2R and $\Delta E2$ -CCK2R. Full-length CCK2R corresponds to protein sequence from aminoacid 1 to 447 and displays 7 transmembrane helices. $\Delta E2$ -CCK2R corresponds to amino acids represented by black letters in red circles. In $\Delta E2$ -CCK2R variant, protein sequence encoded by exon 2 (black letters in black circles) is lacking. (D) Hydrophobicity analysis <http://mobylye.pasteur.fr> of CCK2R (left panel) and $\Delta E2$ -CCK2R (right panel) proteins showing hydrophobic profiles of the two proteins (blue lines), the position of the 7 and 5 hydrophobic segments corresponding to putative membrane spanning domains (vertical red lines). Red and green horizontal lines correspond to upper (1.0) and lower (0.6) cutoffs for certain or putative transmembrane segments, respectively.

with a CCK2R-like pharmacology, is illustrated on Fig. 2C. There was no apparent correlation between level of $\Delta E2$ -CCK2R transcript and that of the CCK2R protein revealed in binding assays. Surprisingly, $\Delta E2$ -CCK2R transcripts were abundant in two tumors (one leiomyosarcoma and one leiomyoma) which were however negative for the presence of the CCK2R protein in the binding assays. In these two tumors, an amplicon with a size and sequence of the intact CCK2R transcript was also obtained by RT-PCR.

3.3. $\Delta E2$ -CCK2R is retained in the endoplasmic reticulum of COS-7 cells

In order to assess activity and pharmacology of $\Delta E2$ -CCK2R, pcDNA₅ plasmid encoding the truncated receptor was expressed transiently in COS-7 cells. We first performed binding assays using

¹²⁵I-CCK which bound to the intact CCK2R with a dissociation constant (K_d) of 0.34 ± 0.3 and 5.2 ± 0.6 nM but which could not bind to COS-7 transfected with the plasmid encoding the $\Delta E2$ -CCK2R (Fig. 3A). To overcome possible defect of binding due to low affinity recognition of the ligand by $\Delta E2$ -CCK2R, we carried out binding of fluorescent CCK probe (Alexa F647-CCK) added at 0.1 μ M to the transfected cells. In such saturating conditions of ligand, no detectable binding could be detected on cells expressing $\Delta E2$ -CCK2R (Fig. 3B). Furthermore, COS-7 cells transfected with $\Delta E2$ -CCK2R did not accumulate inositol phosphates following stimulation with 1 μ M CCK (Fig. 3C). We then considered the possibility that $\Delta E2$ -CCK2R was retained intracellularly. We took advantage of the presence of HA sequence at the N-terminus of $\Delta E2$ -CCK2R to perform immuno-detection using an anti-HA antibody. As shown on Fig. 3D, $\Delta E2$ -CCK2R remained trapped in an intracellular

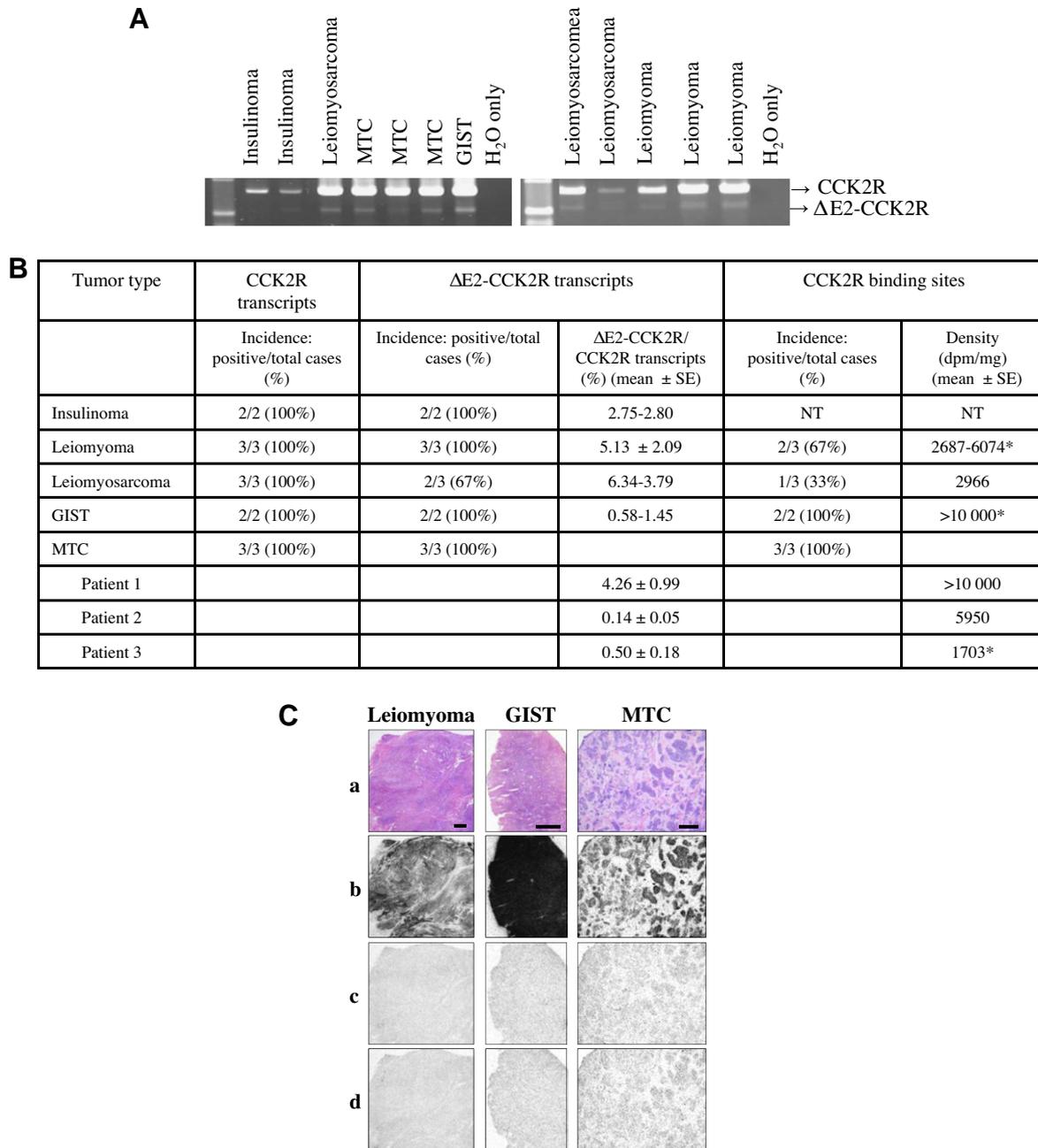


Fig. 2. Expression of CCK2R and ΔE2-CCK2R transcripts and CCK2R binding sites in tumors. (A) RT-PCR transcripts of CCK2 receptors was performed using exon 1 and exon 4 primers of CCK2R. The upper band (0.79 kbp) encodes wild-type isoform and the lower band (0.54 kbp) encodes ΔE2-CCK2R isoform. (B) Receptor transcripts were quantified by real-time qPCR experiments, (NT: not tested). (C) *In vitro* receptor autoradiography on tissue sections to assess CCK2R binding sites in a leiomyoma, a GIST and a MTC referred as * in table B. (a) Haematoxylin and eosin stained tissue sections showing the tumor tissues (bars = 1 mm). (b) Autoradiograms showing total ¹²⁵I-CCK binding to the tumors tissues. (c) Autoradiograms showing total ¹²⁵I-CCK binding in the presence of 50 nM CCK and (d) autoradiograms showing total ¹²⁵I-CCK binding in the presence of 50 nM gastrin.

compartment which was labeled by an anti-calnexin antibody, thus demonstrating retention of ΔE2-CCK2R in the endoplasmic reticulum. In contrast, CCK2R was mostly detected at the cell surface (Fig. 3B).

3.4. ΔE2-CCK2R decreases membrane density and activity of the CCK2R

It has been shown that transport of membrane proteins to the cell surface is dependent on intrinsic molecular signals and multiple molecular filters within the cell (Conn et al., 2007; Dong et al., 2007). Since RT-PCR data showed that ΔE2-CCK2R is present in

tumors expressing intact CCK2R, we evaluated whether expression of ΔE2-CCK2R in COS-7 cells could affect membrane density of the intact CCK2R. In order to address this question, COS-7 cells were transfected with variable ratios of plasmids encoding ΔE2-CCK2R and CCK2R. In a first attempt, transfections with plasmid amounts corresponding to those of transcripts found in tumors yielded data indicating that ΔE2-CCK2R caused a decrease in density of CCK2R at COS-7 cell surface of 18 ± 1%, as revealed by binding assays. However, amounts of receptors were too low to allow immunodetection. We therefore adapted experimental conditions by increasing amounts of transfected plasmids. We found that co-expression of ΔE2-CCK2R and CCK2R in COS-7 cells caused reten-

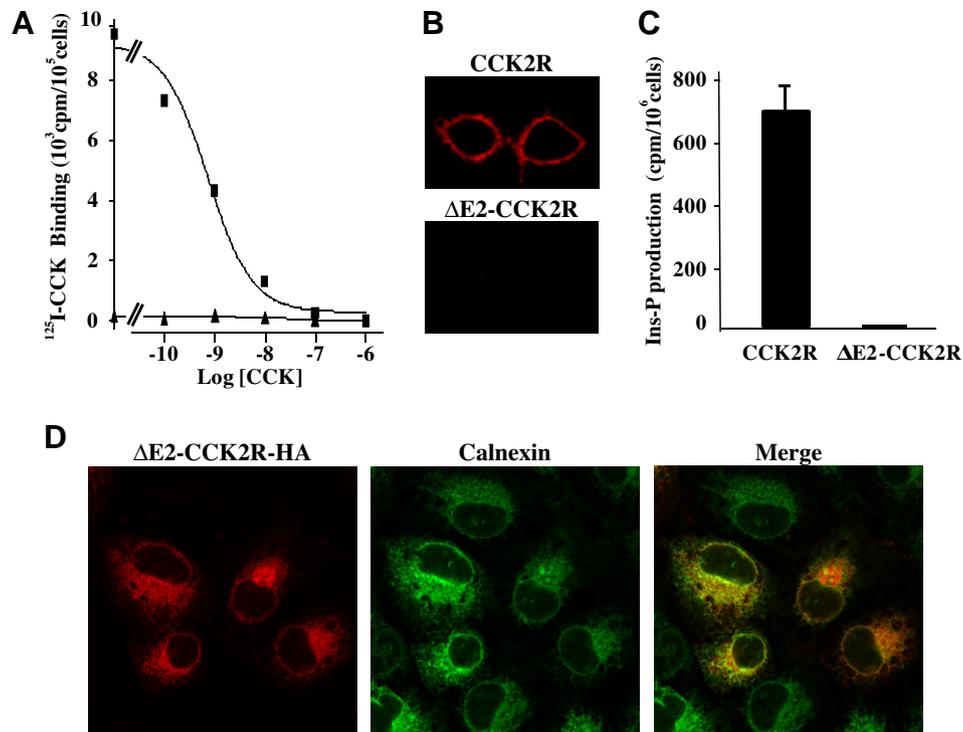


Fig. 3. Cellular localization, binding and activation properties of $\Delta E2$ -CCK2R in transfected COS-7 cells. (A and B) Binding of CCK ligands to $\Delta E2$ -CCK2R. (A) Competition of ^{125}I CCK binding by CCK on CCK2R \blacksquare , or $\Delta E2$ -CCK2R \blacktriangle expressed in COS-7 cells. (B) Alexa F647-CCK binding on CCK2R or $\Delta E2$ -CCK2R expressed in COS-7 cells incubated with Alexa F647-CCK (1 μ M). (C) Activation of $\Delta E2$ -CCK2R. Transfected cells were stimulated with CCK (1 μ M) for 1 h and activation was determined by Inositol Phosphate (Ins-P) accumulation measurement. (D), Immunofluorescence staining of COS-7 cells transfected with HA-tagged $\Delta E2$ -CCK2R. In order to determine localization of $\Delta E2$ -CCK2R, anti-calnexin antibody was used as endoplasmic reticulum marker.

tion and co-localization of intact CCK2R with $\Delta E2$ -CCK2R in an intracellular compartment likely corresponding to endoplasmic reticulum (Fig. 4A). The effect of $\Delta E2$ -CCK2R on density and function of CCK2R at the cell surface was further evaluated by binding experiments and inositol phosphate assays. As shown on Fig. 4B, transfection of $\Delta E2$ -CCK2R caused significant decreases in CCK2R levels at the cell surface ($16.0 \pm 0.5\%$ and $29.9 \pm 1.5\%$).

In line with binding decreases, maximum response of CCK2R activation of phospholipase-C pathway was affected since inositol phosphate production were diminished by 21.7% and 47% in cells co-expressing $\Delta E2$ -CCK2R with no change in potency of CCK (EC_{50} of CCK: 0.48 ± 0.11 nM on CCK2R versus 0.37 ± 0.08 nM on CCK2R in the presence of $\Delta E2$ -CCK2R) (Fig. 5A and B). We further evaluated whether CCK2R-dependent MAP kinase pathway was affected by co-expression of $\Delta E2$ -CCK2R. As illustrated on Fig. 5C and D, CCK-induced phosphorylation of ERK1/2 was significantly decreased when $\Delta E2$ -CCK2R was co-expressed with the CCK2R.

Control experiments with CCK2R-GFP indicated that decreases in CCK2R density and activity in the presence of $\Delta E2$ -CCK2R were not due to decreases in protein synthesis which were of only 6–8% (not illustrated). Furthermore, similar co-expression experiments between $\Delta E2$ -CCK2R and the receptor for glucose insulinotropic polypeptide (GIP), another G protein coupled receptor, showed very small impact of $\Delta E2$ -CCK2R on density of GIP receptor (decrease of GIP receptor density: $3.9 \pm 0.7\%$) which likely reflected decrease in protein synthesis.

4. Discussion

A novel splice variant of the CCK2R lacking exon II has been identified in human tumors, and cloned. This splice variant codes for a CCK2R presenting five putative transmembrane helices

(abbreviated $\Delta E2$ -CCK2R) lacking several aminoacids previously identified as crucial for ligand binding (Dufresne et al., 2006; Fourmy et al., 2002). $\Delta E2$ -CCK2R is retained in the endoplasmic reticulum of the cells. Furthermore, co-expression studies with transfected cells showed that this variant decreases membrane density of the full-length CCK2R and associated agonist-induced signaling such as phospholipase-C and ERK activation, by retaining the CCK2R intracellularly in the endoplasmic reticulum.

Comparison of current data on $\Delta E2$ -CCK2R variant with those related to other CCK2R variants previously identified in cancers indicate that $\Delta E2$ -CCK2R is present in tumors in much higher amounts than other variants (6% of CCK2R for $\Delta E2$ -CCK2R versus levels often much lower than 1% for other variants) (Korner et al., 2010). Moreover, variant $\Delta E2$ -CCK2R cloned here does not display in its own any biological activity in our biological model, however, it may behave as a modulator of CCK2R-mediated activity.

A first important question concerns the reason(s) whereby $\Delta E2$ -CCK2R remains trapped within the endoplasmic reticulum. GPCR trafficking from biosynthetic compartments to the plasma membrane is a sophisticated process, involving private chaperones or escort proteins, motifs on GPCRs that determine the association with proteins that retain or assist GPCRs in their journey, and possibly signaling proteins (Dong et al., 2007). Correct folding of the proteins in the biosynthetic compartment is also required for passing the endoplasmic reticulum export quality control. Although there is no data available on proteins and motifs participating in CCK2R trafficking from ER–Golgi to plasma membrane, it is plausible that a region of the CCK2R, which is missing in the $\Delta E2$ -CCK2R variant, would be important for normal export from ER to plasma membrane. Concerning folding of $\Delta E2$ -CCK2R variant, analysis of its hydrophobicity on the basis of its primary sequence predicted a structure with five transmembrane helices. Variants of the

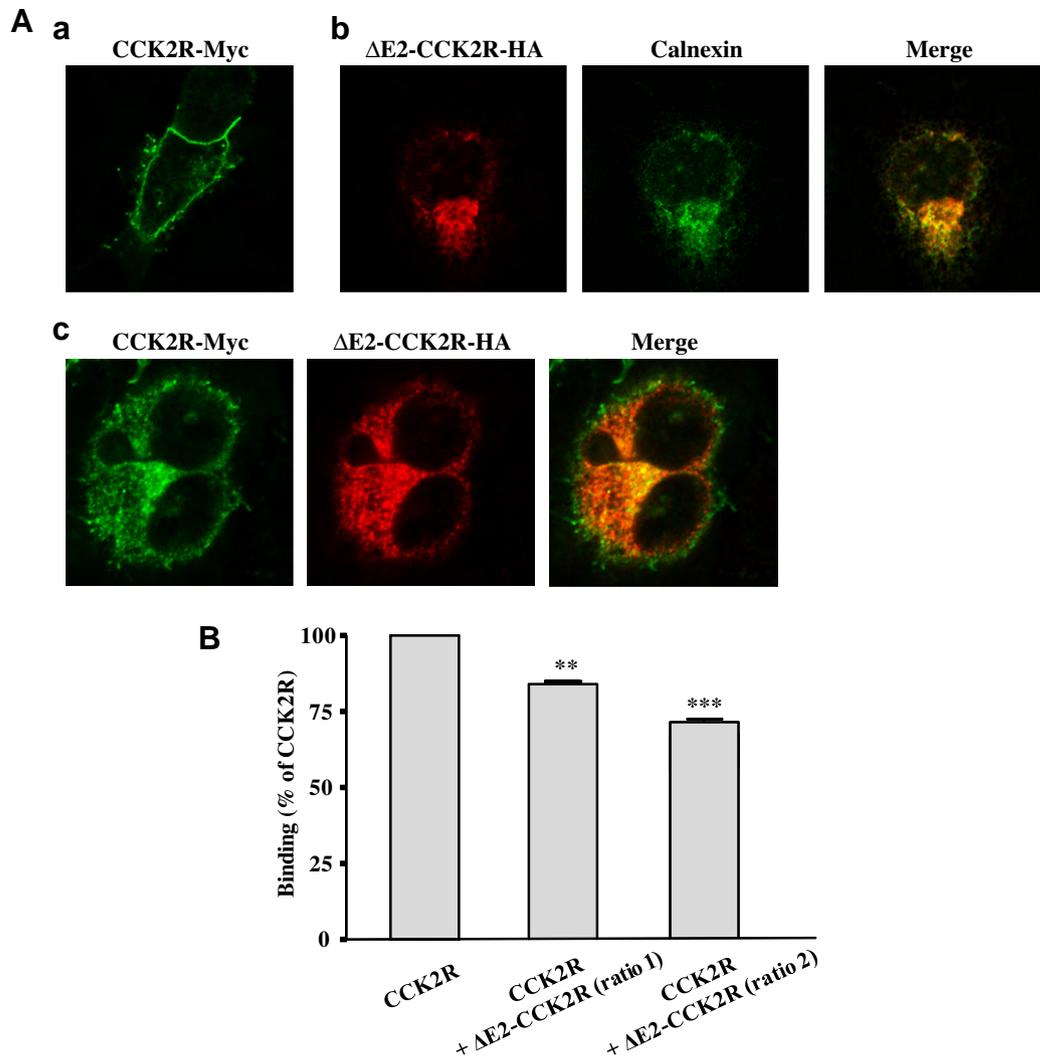


Fig. 4. Impact of $\Delta E2$ -CCK2R on membrane density of CCK2R in transfected COS-7 cells. (A) Immunofluorescence staining was performed on COS-7 cells transfected with Myc-tagged CCK2R plasmid (a), HA-tagged $\Delta E2$ -CCK2R plasmid (b) or both (c). Localization of the receptors was analyzed by dual wavelength confocal microscopy. (B) Binding assay was performed on cells transfected with CCK2R plasmid alone or co-transfected with $\Delta E2$ -CCK2R plasmid. Cells were incubated with Alexa F647-CCK (1 μ M) and binding was measured by flow cytometry. Values are mean \pm SE of three to six separate experiments performed in triplicate, *** P < 0.001, ** P < 0.01 versus binding to COS-7 cells expressing CCK2R alone.

CCR5 and CXCR4 chemokine receptors structurally similar to $\Delta E2$ -CCK2R variant, were reported to reach plasma membrane of transfected human embryonic kidney cells (HEK) 293 cells (Ling et al., 1999) whereas a variant of the somatostatin receptor type 5 (sst5) predominantly localized intracellularly (Duran-Prado et al., 2009). We verified that transfection of $\Delta E2$ -CCK2R variant in HEK293 cells produced the same endoplasmic reticulum retention as in COS-7 cells (not shown). Retention of $\Delta E2$ -CCK2R variant in the endoplasmic reticulum of both HEK293 and COS-7 cells is however in line with reports indicating that many G protein-coupled receptors are associated with a disease lack function due to their inability to pass the quality control step, and therefore to reach the cell surface (Conn et al., 2007; Robben et al., 2009).

An important second question concerns the mechanism whereby $\Delta E2$ -CCK2R variant retains the CCK2R in the endoplasmic reticulum of COS-7 cells in a manner of a dominant negative. As a likely explanation, we propose that $\Delta E2$ -CCK2R and CCK2R dimerize early after biosynthesis in the endoplasmic reticulum and this dimerization hinders normal transport of the CCK2R to plasma membrane. Homo- and hetero-dimerization of the CCK2R in transfected cells was previously reported (Cheng et al., 2003). Our

dimerization hypothesis is furthermore supported by experimental observations that G protein coupled receptors such as Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and hetero-dimers during biosynthesis (Terrillon et al., 2003) and can be activated in the endoplasmic reticulum by cell-permeant ligands (Robben et al., 2009). Splice variants exhibiting dominant negative effects on the membrane density of wild-type receptors have been reported for the Histamine H4 receptor and the GIP receptor (Harada et al., 2008; van Rijn et al., 2008). Conversely, the presence of several G protein coupled receptors at the cell surface has been shown to be enhanced or even to be dependent on co-expression of another receptor (Hague et al., 2004a,b).

Abnormal splicing of pre-mRNA is frequent in tumors and is considered as a mean for malignant cells to increase gene coding diversity (Pajares et al., 2007). The mechanism underlying abnormal splicing leading to deletion of exon 2 in the CCK2R pre-mRNA is unknown. The presence of mutations in the gene encoding the CCK2R and/or defect in the splicing machinery which involves multicomponent complexes consisting of small nuclear ribonucleoproteins and many other proteins, could cause expression of $\Delta E2$ -CCK2R variant (Pajares et al., 2007). Previously, it has been

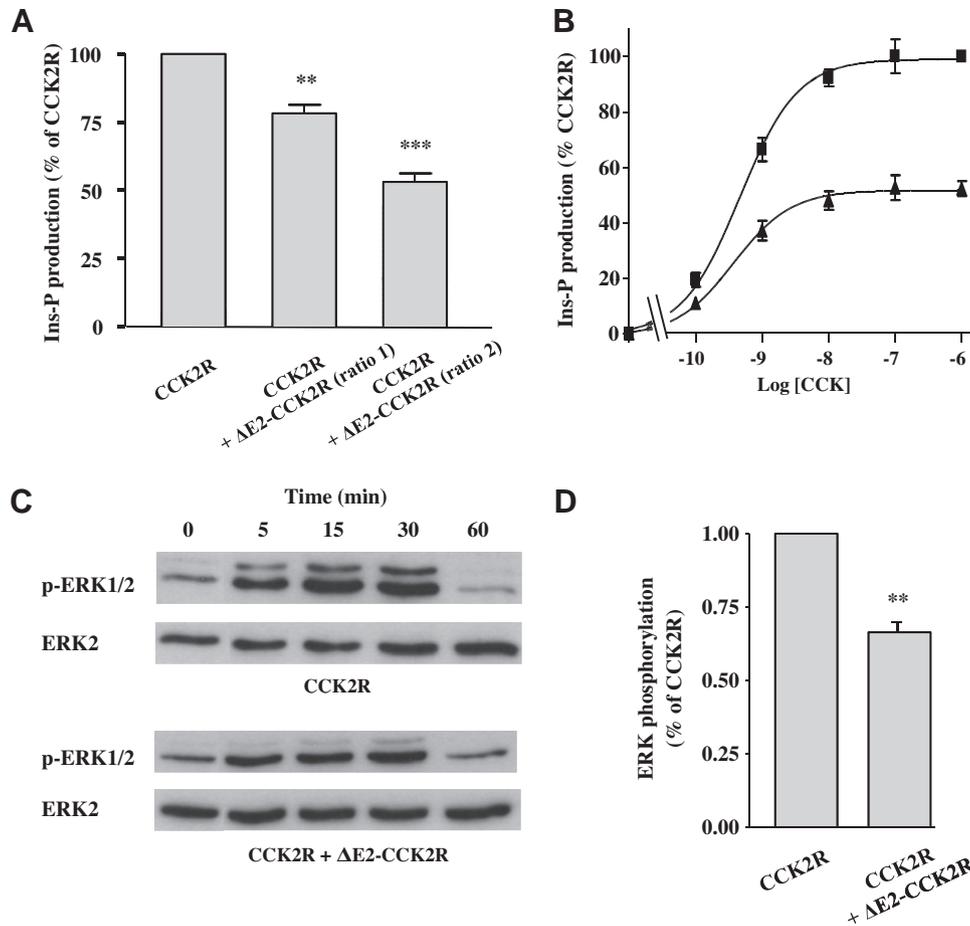


Fig. 5. Impact of $\Delta E2$ -CCK2R on CCK2R signaling. (A) Ins-P accumulation assays. COS-7 cells were transfected with CCK2R plasmid alone or co-transfected with $\Delta E2$ -CCK2R plasmid. Cells were incubated with CCK (1 μM) for 1 h and Ins-P accumulation was measured. (B) Cells were transfected with CCK2R plasmid alone (\blacksquare) or co-transfected with CCK2R and $\Delta E2$ -CCK2R (\blacktriangle) plasmid. Ins-P accumulation was measured upon increasing concentrations of CCK during 1 h. (C) ERK1/2 activation was measured, using an antibody against phosphorylated ERK1/2, after stimulation with CCK (0.1 μM) for indicated times. (D) Quantification of ERK1/2 activation for 15 min of stimulation. Values are mean \pm SE of three to six separate experiments, *** P < 0.001, ** P < 0.01 versus Ins-P production or ERK phosphorylation in COS-7 cells expressing CCK2R alone.

reported that expression of a CCK2R variant (CCK2Ri4sv) in pancreatic carcinoma was due to abnormal expression of U2 small nuclear ribonucleoprotein splicing factors (Ding et al., 2002). CCK2Ri4sv splice variant, which was initially identified in colorectal cancers, has the fourth intron abnormally retained (Hellmich et al., 2000). This splice mRNA variant encodes a protein having an additional 69 amino acids in the third intracellular loop of the CCK2R. Correspondingly, CCK2Ri4sv was reported to exhibit constitutive activity in transfected cells leading to enhanced MAP kinase and Src kinase phosphorylation, and basal calcium mobilization (Hellmich et al., 2000; Olszewska-Pazdrak et al., 2004). Moreover, cells expressing CCK2Ri4sv splice variant were reported to have enhanced basal and ligand stimulated proliferation (Hellmich et al., 2000). However, these data are still controversial since abundance of variant transcript in colorectal cancers as well as its constitutive activity were not always confirmed (Cheng et al., 2005; Korner et al., 2010). Two other CCK2R transcript variants, isolated from gastric cancer cells and colorectal cancers were described (Miyake, 1995; Schmitz et al., 2001).

The demonstration of the clinical relevance of the expression of $\Delta E2$ -CCK2R in human tumors will require further investigations on a large series of tumor samples as our current study used a highly heterogeneous series of samples with only few cases per tumor type and thus could not permit a meaningful correlative evaluation with any kind of clinical parameters. However, our findings must be examined in light to data which previously identified CCK2R

in a large variety of human cancers and documented proliferative effects of this receptor. For tumors arising within the gastrointestinal tract, several studies have demonstrated an expression of CCK2R transcripts in colonic, pancreatic and gastric cancers (Clerc et al., 1997; Goetze et al., 2000). However, most studies failed to find significant amounts of CCK2R binding sites in these tumor types suggesting that functional CCK2R are present at low densities in neoplastic cells (Reubi et al., 2003, 1999). Conversely, it is well established that high densities of CCK2R are present in most insulinomas, carcinoids, GIST, small cell lung cancers and medullary thyroid carcinomas (Reubi, 2003). It is conceivable that densities of CCK2R binding sites found in cancers might be affected by expression of $\Delta E2$ -CCK2R. The proliferative action of the CCK2R has been more abundantly documented on gastric, colonic and pancreatic cancer cell lines than on cells lines derived from tumors having high densities of CCK2R (Aly et al., 2004; Ferrand and Wang, 2006). However, several studies reported oncogenic role of the CCK2R in cancer cell lines originating from carcinoids (Kidd et al., xxx; Nakata et al., 1992), small cell lung cancers (Sethi et al., 1993; Sethi and Rozengurt, 1992) and medullary thyroid carcinomas (Blaker et al., 2004, 2002). Interestingly, a precedent exists showing expression of a somatostatin receptor variant that may have important impact in clinical oncology. Indeed, splice variants of somatostatin receptor type 5 (sst5) lacking one or more transmembrane domains were identified and shown to display divergent responses to ligands of this receptor and predominant

intracellular retention (Duran-Prado et al., 2009, 2010). Interestingly, when co-expressed in the same cell, sst5 variant co-localizes with full-length sst5. Expression of this variant was negatively correlated with the ability of octreotide (an analogue of somatostatin) to inhibit growth hormone secretion *in vivo* in patients with a pituitary tumor (Duran-Prado et al., 2010).

5. Conclusion

A novel splice variant with five putative transmembrane domains has been identified and cloned from tumors expressing the CCK2R. Ectopic expression of this variant in COS-7 cells revealed that it lacks biological activity in this biological model but instead can behave as a dominant negative on density of native CCK2R at the cell surface and as a consequence, on its activity. Owing to oncogenic potential of the CCK2R, further investigations are required to determine the eventual clinical relevance of these findings, particularly the relationship between expression of the novel splice variant and the pathophysiology of certain tumors, and for *in vivo* CCK2R-targeting.

Acknowledgements

We thank: Dr Romina D'Angelo from Cellular Imaging Facility Ranguel (I2MC/TRI Platform), for the excellent technical support and advices with confocal microscopy and images analysis; Jean-José Maoret from Genomic and Molecular Biology platform (INSERM U1048) for assistance and excellent advices. We also thank Drs Cathy Seva, Pierre Cordelier and Stephane Pyronnet for their advices in the course of the study. The work was supported by Grants from Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC N° 4870) and Ligue Nationale Contre le Cancer (comité 31).

References

Aly, A., Shulkes, A., Baldwin, G.S., 2004. Gastrins, cholecystokinins and gastrointestinal cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1704, 1–10.

Blaker, M., Arrenberg, P., Stange, I., Schulz, M., Burghardt, S., Michaelis, H., Pace, A., Greten, H., von Schrenck, T., de Weerth, A., 2004. The cholecystokinin2-receptor mediates calcitonin secretion, gene expression, and proliferation in the human medullary thyroid carcinoma cell line, TT. *Regul. Pept.* 118, 111–117.

Blaker, M., de Weerth, A., Tometten, M., Schulz, M., Hoppner, W., Arlt, D., Hoang-Vu, C., Dralle, H., Terpe, H., Jonas, L., et al., 2002. Expression of the cholecystokinin 2-receptor in normal human thyroid gland and medullary thyroid carcinoma. *Eur. J. Endocrinol.* 146, 89–96.

Cheng, Z.J., Hari Kumar, K.G., Ding, W.Q., Holicky, E.L., Miller, L.J., 2005. Analysis of the cellular and molecular mechanisms of trophic action of a misspliced form of the type B cholecystokinin receptor present in colon and pancreatic cancer. *Cancer Lett.* 222, 95–105.

Cheng, Z.J., Hari Kumar, K.G., Holicky, E.L., Miller, L.J., 2003. Heterodimerization of type A and B cholecystokinin receptors enhance signaling and promote cell growth. *J. Biol. Chem.* 278, 52972–52979.

Clerc, P., Dufresne, M., Saillan, C., Chastre, E., Andre, T., Escrieut, C., Kennedy, K., Vaysse, N., Gaspach, C., Fourmy, D., 1997. Differential expression of the CCK-A and CCK-B/gastrin receptor genes in human cancers of the esophagus, stomach and colon. *Int. J. Cancer* 72, 931–936.

Conn, P.M., Ulloa-Aguirre, A., Ito, J., Janovick, J.A., 2007. G protein-coupled receptor trafficking in health and disease: lessons learned to prepare for therapeutic mutant rescue *in vivo*. *Pharmacol. Rev.* 59, 225–250.

Ding, W.Q., Kuntz, S.M., Miller, L.J., 2002. A misspliced form of the cholecystokinin-B/gastrin receptor in pancreatic carcinoma: role of reduced cellular U2AF35 and a suboptimal 3'-splicing site leading to retention of the fourth intron. *Cancer Res.* 62, 947–952.

Dong, C., Filipeanu, C.M., Duvernay, M.T., Wu, G., 2007. Regulation of G protein-coupled receptor export trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 853–870.

Dorsam, R.T., Gutkind, J.S., 2007. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 79–94.

Dufresne, M., Seva, C., Fourmy, D., 2006. Cholecystokinin and gastrin receptors. *Physiol. Rev.* 86, 805–847.

Duran-Prado, M., Gahete, M.D., Martinez-Fuentes, A.J., Luque, R.M., Quintero, A., Webb, S.M., Benito-Lopez, P., Leal, A., Schulz, S., Gracia-Navarro, F., et al., 2009. Identification and characterization of two novel truncated but functional isoforms of the somatostatin receptor subtype 5 differentially present in pituitary tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 2634–2643.

Duran-Prado, M., Saveanu, A., Luque, R.M., Gahete, M.D., Gracia-Navarro, F., Jaquet, P., Dufour, H., Malagon, M.M., Culler, M.D., Barlier, A., et al., 2010. A potential inhibitory role for the new truncated variant of somatostatin receptor 5, sst5TMD4, in pituitary adenomas poorly responsive to somatostatin analogs. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 2497–2502.

Ferrand, A., Wang, T.C., 2006. Gastrin and cancer: a review. *Cancer Lett.* 238, 15–29.

Fourmy, D., Escrieut, C., Archer, E., Gales, C., Gigoux, V., Maigret, B., Moroder, L., Silvente-Poirot, S., Martinez, J., Fehrentz, J.A., et al., 2002. Structure of cholecystokinin receptor binding sites and mechanism of activation/inactivation by agonists/antagonists. *Pharmacol. Toxicol.* 91, 313–320.

Fourmy, D., Lopez, P., Poirot, S., Jimenez, J., Dufresne, M., Moroder, L., Powers, S.P., Vaysse, N., 1989. A new probe for affinity labelling pancreatic cholecystokinin receptor with minor modification of its structure. *Eur. J. Biochem.* 185, 397–403.

Gibril, F., Jensen, R.T., 2004. Diagnostic uses of radiolabelled somatostatin receptor analogues in gastroenteropancreatic endocrine tumours. *Dig. Liver Dis.* 36 (1), S106–S120.

Goetze, J.P., Nielsen, F.C., Burchardt, F., Rehfeld, J.F., 2000. Closing the gastrin loop in pancreatic carcinoma: coexpression of gastrin and its receptor in solid human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 88, 2487–2494.

Hague, C., Uberti, M.A., Chen, Z., Bush, C.F., Jones, S.V., Ressler, K.J., Hall, R.A., Minneman, K.P., 2004a. Olfactory receptor surface expression is driven by association with the beta2-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 13672–13676.

Hague, C., Uberti, M.A., Chen, Z., Hall, R.A., Minneman, K.P., 2004b. Cell surface expression of alpha1D-adrenergic receptors is controlled by heterodimerization with alpha1B-adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* 279, 15541–15549.

Harada, N., Yamada, Y., Tsukiyama, K., Yamada, C., Nakamura, Y., Mukai, E., Hamasaki, A., Liu, X., Toyoda, K., Seino, Y., et al., 2008. A novel GIP receptor splice variant influences GIP sensitivity of pancreatic beta-cells in obese mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294, E61–E68.

Hellmich, M.R., Rui, X.L., Hellmich, H.L., Fleming, R.Y., Evers, B.M., Townsend Jr., C.M., 2000. Human colorectal cancers express a constitutively active cholecystokinin-B/gastrin receptor that stimulates cell growth. *J. Biol. Chem.* 275, 32122–32128.

Kidd, M., Siddique, Z.L., Drozdov, I., Gustafsson, B.I., Camp, R.L., Black, J.W., Boyce, M., Modlin, I.M. The CCK(2) receptor antagonist, YF476, inhibits Mastomys ECL cell hyperplasia and gastric carcinoid tumor development. *Regul. Pept.* 162 52–60.

Korner, M., Waser, B., Reubi, J.C., Miller, L.J., 2010. CCK(2) receptor splice variant with intron 4 retention in human gastrointestinal and lung tumours. *J. Cell Mol. Med.* 14, 933–943.

Kwekkeboom, D.J., Teunissen, J.J., Bakker, W.H., Kooij, P.P., de Herder, W.W., Feelders, R.A., van Eijck, C.H., Esser, J.P., Kam, B.L., Krenning, E.P., 2005. Radiolabeled somatostatin analog [177Lu-DOTA0, Tyr3]octreotate in patients with endocrine gastroenteropancreatic tumors. *J. Clin. Oncol.* 23, 2754–2762.

Ling, K., Wang, P., Zhao, J., Wu, Y.L., Cheng, Z.J., Wu, G.X., Hu, W., Ma, L., Pei, G., 1999. Five-transmembrane domains appear sufficient for a G protein-coupled receptor: functional five-transmembrane domain chemokine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 7922–7927.

Marchal-Victorin, S., Vionnet, N., Escrieut, C., Dematos, F., Dina, C., Dufresne, M., Vaysse, N., Pradayrol, L., Froguel, P., Fourmy, D., 2002. Genetic, pharmacological and functional analysis of cholecystokinin-1 and cholecystokinin-2 receptor polymorphism in type 2 diabetes and obese patients. *Pharmacogenetics* 12, 23–30.

Miyake, A., 1995. A truncated isoform of human CCK-B/gastrin receptor generated by alternative usage of a novel exon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208, 230–237.

Moroder, L., Wilschowitz, L., Gemeiner, M., Gohring, W., Knof, S., Scharf, R., Thamm, P., Gardner, J.D., Solomon, T.E., Wunsch, E., 1981. Cholecystokinin-pancreozymin synthesis. Synthesis of 28-threonine, 31-norleucine- and 28-threonine, 31-leucinecholecystokinin-pancreozymin-(25–33)-nonapeptide. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 362, 929–942.

Nakata, H., Matsui, T., Ito, M., Taniguchi, T., Narabayashi, Y., Arima, N., Nakamura, A., Kinoshita, Y., Chihara, K., Hosoda, S., et al., 1992. Cloning and characterization of gastrin receptor from ECL carcinoid tumor of Mastomys natalensis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 1151–1157.

Olzewska-Pazdrak, B., Townsend Jr., C.M., Hellmich, M.R., 2004. Agonist-independent activation of Src tyrosine kinase by a cholecystokinin-2 (CCK2) receptor splice variant. *J. Biol. Chem.* 279, 40400–40404.

Pajares, M.J., Ezponda, T., Catena, R., Calvo, A., Pio, R., Montuenga, L.M., 2007. Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *Lancet Oncol.* 8, 349–357.

Parma, J., Duprez, L., Van Sande, J., Cochaux, P., Gervy, C., Mockel, J., Dumont, J., Vassart, G., 1993. Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature* 365, 649–651.

Reubi, J.C., 2001. CCK receptors in human neuroendocrine tumors: clinical implications. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 234, 101–104.

Reubi, J.C., 2003. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr. Rev.* 24, 389–427.

Reubi, J.C., Schaer, J.C., Waser, B., 1997. Cholecystokinin(CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors. *Cancer Res.* 57, 1377–1386.

Reubi, J.C., Waser, B., 1996. Unexpected high incidence of cholecystokinin-B/gastrin receptors in human medullary thyroid carcinomas. *Int. J. Cancer* 67, 644–647.

Reubi, J.C., Waser, B., Gugger, M., Friess, H., Kleeff, J., Kayed, H., Buchler, M.W., Laissue, J.A., 2003. Distribution of CCK1 and CCK2 receptors in normal and diseased human pancreatic tissue. *Gastroenterology* 125, 98–106.

- Reubi, J.C., Waser, B., Schmassmann, A., Laissue, J.A., 1999. Receptor autoradiographic evaluation of cholecystokinin, neurotensin, somatostatin and vasoactive intestinal peptide receptors in gastro-intestinal adenocarcinoma samples: where are they really located? *Int. J. Cancer* 81, 376–386.
- Robben, J.H., Kortenoeven, M.L., Sze, M., Yae, C., Milligan, G., Oorschot, V.M., Klumperman, J., Knoers, N.V., Deen, P.M., 2009. Intracellular activation of vasopressin V2 receptor mutants in nephrogenic diabetes insipidus by nonpeptide agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 12195–12200.
- Schmitz, F., Otte, J.M., Stechele, H.U., Reimann, B., Banasiewicz, T., Folsch, U.R., Schmidt, W.E., Herzig, K.H., 2001. CCK-B/gastrin receptors in human colorectal cancer. *Eur. J. Clin. Invest* 31, 812–820.
- Sethi, T., Herget, T., Wu, S.V., Walsh, J.H., Rozengurt, E., 1993. CCKA and CCKB receptors are expressed in small cell lung cancer lines and mediate Ca^{2+} mobilization and clonal growth. *Cancer Res.* 53, 5208–5213.
- Sethi, T., Rozengurt, E., 1992. Gastrin stimulates Ca^{2+} mobilization and clonal growth in small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 52, 6031–6035.
- Terrillon, S., Durroux, T., Mouillac, B., Breit, A., Ayoub, M.A., Taulan, M., Jockers, R., Barberis, C., Bouvier, M., 2003. Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol. Endocrinol.* 17, 677–691.
- van Rijn, R.M., van Marle, A., Chazot, P.L., Langemeijer, E., Qin, Y., Shenton, F.C., Lim, H.D., Zuiderveld, O.P., Sansuk, K., Dy, M., et al., 2008. Cloning and characterization of dominant negative splice variants of the human histamine H4 receptor. *Biochem. J.* 414, 121–131.
- Waldherr, C., Pless, M., Maecke, H.R., Schumacher, T., Crazzolara, A., Nitzsche, E.U., Haldemann, A., Mueller-Brand, J., 2002. Tumor response and clinical benefit in neuroendocrine tumors after 7.4 GBq (90)Y-DOTATOC. *J. Nucl. Med.* 43, 610–616.
- Yaqub, T., Tikhonova, I.G., Lattig, J., Magnan, R., Laval, M., Escrieut, C., Boulegue, C., Hewage, C., Fourmy, D., 2010. Identification of determinants of glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor that interact with N-terminal biologically active region of the natural ligand. *Mol. Pharmacol.* 77, 547–558.

DISCUSSION

Ce travail a permis la découverte d'un nouveau variant d'épissage du récepteur CCK2: le $\Delta E2$ -CCK2R, qui est délété de l'exon 2. L'ARNm de ce variant a été détecté dans la quasi-totalité des tumeurs testées (12/13), c'est-à-dire dans des insulinomes, des MTC, des leiomyomes, des leiomyosarcomes et des GIST. Le taux d'expression du $\Delta E2$ -CCK2R par rapport au récepteur sauvage est relativement élevé (2 à 6%), notamment si l'on considère les données obtenues pour le variant CCK2Ri4sv dans les tumeurs neuroendocrines (0.2 à 1.4%) [146]. Le faible échantillonnage de tumeurs analysées ici ne permet pas d'établir une corrélation entre le niveau d'expression du variant et le type de tumeur. De plus, il serait intéressant, lors de la recherche du $\Delta E2$ -CCK2R dans un plus grand nombre de tissus tumoraux, de recueillir des informations cliniques, telles que le grade tumoral.

Caractérisation du variant $\Delta E2$ -CCK2R

L'analyse de l'ADN complémentaire cloné à partir des tissus tumoraux n'a révélée aucune mutation pouvant expliquer l'épissage alternatif qui aboutit à la délétion de l'exon 2. Le séquençage de l'ADN génomique permettrait de déterminer s'il existe des mutations dans les séquences non codantes responsables de ce phénomène. D'autre part, cela pourrait être la conséquence d'une modification de l'expression de protéines impliquées dans la machinerie d'épissage, comme cela arrive fréquemment dans les cancers [343]. En effet, une étude sur le variant CCK2Ri4sv rapporte que la rétention de l'intron 4 serait liée à la baisse d'expression du facteur d'épissage U2AF35 [145].

Nous n'avons malheureusement pas pu vérifier l'expression protéique du $\Delta E2$ -CCK2R dans les tissus tumoraux. Il n'existe pas d'anticorps fiables dirigés contre le RCCK2, et la génération d'un anticorps spécifique du $\Delta E2$ -CCK2R qui ne reconnaîtrait pas la forme sauvage semble difficilement réalisable. En effet, le seul antigène possible pour la production de cet anticorps correspond à la séquence de la jonction de l'exon 1 et 3. Néanmoins, la transfection de l'ADNc du $\Delta E2$ -CCK2R dans des cellules COS-7 ou HEK-FlpIn montre que l'altération de la séquence codante n'empêche pas la synthèse protéique du variant. L'exon 2 codant pour les deux premiers domaines transmembranaires du RCCK2, la structure prédictive du variant $\Delta E2$ -CCK2R est une protéine qui possède 5 domaines transmembranaires. Bien que cette structure soit suffisante pour l'adressage membranaire et

l'activation de variants des récepteurs CCR5 et CXCR4 [344], ça n'est pas le cas du $\Delta E2$ -CCK2R. En effet, celui-ci ne possède pas d'activité propre et n'est pas exprimé à la membrane plasmique, mais il est localisé dans le réticulum endoplasmique (RE). Cet organite est responsable de la synthèse et la conformation des protéines destinées à la voie sécrétoire. Il possède un important système de contrôle afin d'éviter que des protéines mal structurées ou agrégées soient sécrétées. Ce système UPR (unfold protein response) implique l'intervention de chaperonnes qui reconnaissent les protéines défectueuses et les adressent à la dégradation [345, 346]. La rétention du $\Delta E2$ -CCK2R dans le RE pourrait être la conséquence de l'activation du système UPR afin d'empêcher l'adressage membranaire de cette protéine aberrante. En effet, il existe des exemples de variants de RCPG dont l'absence d'expression membranaire a été associée à des effets pathologiques. C'est le cas d'un mutant du récepteur de la vasopresine V2 qui provoque le développement d'un diabète insipide [347]. Cependant, la séquestration des RCPG mutants dans le RE est très variable, puisque certains d'entre eux vont être retenus [347-349] alors que d'autres vont être adressés à la membrane plasmique [344], voire même être sécrétés [350].

Impact du variant $\Delta E2$ -CCK2R sur le récepteur sauvage

La totalité des tumeurs qui expriment le $\Delta E2$ -CCK2R sont également positives pour la présence des transcripts du récepteur sauvage. Dans le système cellulaire COS-7 transfecté avec les deux formes du récepteur CCK2, le $\Delta E2$ -CCK2R entraîne une diminution de l'adressage membranaire du récepteur sauvage. Or l'une des conséquences du stress du RE lié à l'accumulation de protéines aberrantes est la réduction de la synthèse protéique. Nous nous sommes donc assurés que la baisse d'expression membranaire du RCCK2 en présence du $\Delta E2$ -CCK2R n'était pas liée à la diminution de la synthèse protéique du récepteur sauvage.

La rétention du récepteur sauvage dans le RE pourrait résulter d'une hétéro-dimérisation avec le $\Delta E2$ -CCK2R. En effet, l'homo- et l'hétéro-dimérisation du RCCK2 a déjà été rapportée [105]. De plus, il existe des exemples de formation d'hétéro-dimères qui ont lieu dans le RE [351] et qui régulent l'adressage membranaire du dimère, soit en l'inhibant (variant du récepteur GIP [348] ou du récepteur de l'histamine H4 [352]) soit en le favorisant (récepteur Adrénérrique- α_{1D} et α_{1B} [353]). Il serait donc intéressant de vérifier si ce phénomène de dimérisation se produit entre les 2 formes du RCCK2.

D'autre part la baisse d'expression membranaire du RCCK2 provoquée par le $\Delta E2$ -CCK2R suggère que le variant pourrait jouer un rôle dans l'activité physiopathologique du récepteur sauvage. Pour vérifier cela, il est important de réaliser une étude sur un modèle

cellulaire tumoral qui exprimerait de façon endogène les deux formes du récepteur. Cela pourrait permettre une meilleure compréhension du rôle oncogénique potentiel du RCCK2 dans les lignées tumorales neuroendocrines. La régulation de l'expression membranaire du RCCK2 par le $\Delta E2$ -CCK2R pourrait expliquer les divergences dans la détection du récepteur sauvage au niveau transcriptionnel et traductionnel observées pour certaines tumeurs. Cet élément est important dans le cadre du ciblage radiothérapeutique du RCCK2.

ARTICLE II

**Glucose-dependent Insulinotropic polypeptide
receptors in most gastroenteropancreatic and
bronchial neuroendocrine tumors**

INTRODUCTION

Le récepteur GIP (RGIP) est un membre de la famille des RCPG qui est exprimé notamment dans le pancréas, le tissu adipeux, l'estomac, le tissu osseux et le cerveau [354]. Le RGIP est essentiellement connu pour son implication dans la modulation de la régulation de l'homéostasie glucidique et lipidique de l'organisme. En effet, le GIP est une hormone sécrétée par les cellules K du duodénum proximal en réponse à la prise alimentaire. Sa liaison au récepteur GIP exprimé sur les cellules β des îlots de Langerhans stimule la sécrétion d'insuline de façon dépendante du glucose. Le GIP et le GLP-1 (glucagon peptide like-1) sont des hormones incrétines responsables d'environ 50 à 70% de la sécrétion d'insuline postprandiale [354, 355]. Cet effet « incrétine » est strictement dépendant du glucose et est crucial pour le maintien de l'homéostasie glucidique. De plus, le GIP accroît cet effet en stimulant la transcription et la traduction du gène de la pro-insuline, et en inhibant la production de glucose hépatique.

Cependant, l'effet incrétine est très fortement altéré chez les diabétiques de type 2. Cette pathologie est caractérisée par une hyperglycémie associée à une diminution de la quantité de GLP-1 circulante, qui peut être réversée par l'administration de GLP-1 exogène. Cela signifie que le RGLP-1 est toujours fonctionnel. En revanche, la quantité de GIP sécrétée n'est que peu altérée, alors que l'effet insulino-tropique dépendant du GIP est fortement diminué chez les patients diabétiques [356, 357]. La diminution de la réponse au GIP chez les diabétiques de type 2 n'est pas très bien caractérisée, cependant des travaux suggèrent que l'hyperglycémie pourrait être associée à une régulation négative de l'expression du RGIP dans les îlots pancréatiques [358, 359].

Récemment, l'expression du récepteur GLP-1 a été détectée dans la majorité des insulinomes, avec une incidence et une densité nettement supérieures à celle des récepteurs de la somatostatine [50, 52]. Cela a d'ailleurs conduit au développement d'analogues radiomarqués de GLP-1 qui ont permis la détection des insulinomes chez la totalité des patients testés, alors que les techniques d'imagerie conventionnelles avaient donné des résultats peu convaincants [55, 360]. Les insulinomes étant des tumeurs qui affectent les cellules β , nous nous sommes interrogés sur l'expression du RGIP dans ces tumeurs. La mise en place d'une collaboration nous a permis de définir l'expression du RGIP dans les tumeurs neuroendocrines, au niveau transcriptionnel grâce à des expériences de RT-PCR et au niveau protéique par des expériences d'autoradiographie des récepteurs.

Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Receptors in Most Gastroenteropancreatic and Bronchial Neuroendocrine Tumors

Beatrice Waser, Ruth Rehmann, Claire Sanchez, Daniel Fourmy, and Jean Claude Reubi

Division of Cell Biology and Experimental Cancer Research (B.W., R.R., J.C.R.), Institute of Pathology, University of Berne, CH-3010 Berne, Switzerland; and Institute Louis Bugnard (C.S., D.F.), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, F-31432 Toulouse, France

Context: Gastrointestinal peptide hormone receptors overexpressed in neuroendocrine tumors (NET), such as somatostatin or glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors, are used for *in vivo* tumor targeting. Unfortunately, not all NET express these receptors sufficiently.

Objective: Our aim was to evaluate *in vitro* the expression of another incretin receptor, glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor, in human tumors and compare it with that in adjacent nonneoplastic tissues and also with somatostatin and GLP-1 receptor expression.

Methods: GIP receptor protein expression was qualitatively and quantitatively investigated in 260 human tumors and in nonneoplastic human tissues with receptor autoradiography using [¹²⁵I]GIP(1–30). Pharmacological competition experiments and mRNA analysis were performed to provide proof of specificity. Somatostatin receptor and GLP-1 receptor autoradiography were performed in adjacent sections.

Results: GIP receptors are expressed in the majority of pancreatic, ileal, and bronchial NET. Importantly, most of the somatostatin receptor-negative NET and GLP-1 receptor-negative malignant insulinomas are GIP receptor positive. Conversely, the epithelial and stromal gastrointestinal tumors, including gastric, colonic, and hepatocellular carcinomas, cholangiocarcinomas, and gastrointestinal stromal tumors as well as lung adenocarcinomas are usually GIP receptor negative, except for 26% of pancreatic adenocarcinomas. Pancreatic islets, but not acini, are GIP receptor positive. The rank order of potencies for receptor binding and mRNA analysis by PCR reveal specific GIP receptors.

Conclusions: The numerous GIP receptors in gastroenteropancreatic and bronchial NET represent novel universal molecular targets for clinical applications, in particular for *in vivo* scintigraphy and targeted radiotherapy. These results may also be the basis for multiple targeting, with concomitant use of GIP, somatostatin, and GLP-1 analogs as radiotracers. (*J Clin Endocrinol Metab* 97: 482–488, 2012)

Peptide receptor targeting of tumors, in particular somatostatin receptor targeting and, more recently, glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor targeting of neuroendocrine tumors (NET), has been established as a useful diagnostic and/or radiotherapeutic tool for clinicians (1–3). The success of this method is based on the overexpression of

the respective receptors in those tumors, whereas the normal physiological tissues surrounding the tumors express usually a much lower level of these receptors (4, 5). Unfortunately, not all NET express somatostatin or GLP-1 receptors, leaving a significant number of patients without the advantage of this otherwise successful targeting method.

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197
Printed in U.S.A.

Copyright © 2012 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2011-2454 Received September 1, 2011. Accepted October 27, 2011.

First Published Online November 23, 2011

Abbreviations: GIP, Glucose-dependent insulinotropic polypeptide; GIST, gastrointestinal stromal tumor; GLP-1, glucagon-like peptide-1; NET, neuroendocrine tumor.

We have therefore evaluated the overexpression of another incretin receptor, the glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor (6, 7), in tumors *in vitro*, with the aim to detect a potential overexpression that would allow targeting *in vivo* such tumors with GIP-related radioligands.

GIP, as well as GLP-1, belongs to the family of incretins (6). These are related hormones secreted from the gastrointestinal mucosa in response to nutrient entry that play a predominant role in glucose homeostasis by stimulating insulin secretion. Both GIP and GLP-1 exert their effects through interaction with structurally related G protein-coupled receptors, which exhibit considerable amino acid homology and use overlapping signal transduction pathways in β -cells of pancreatic islets. Several incretin analogs, specifically GLP-1 analogs, have already been developed for diabetes therapy (7–11), whereas GIP analogs are still in an earlier stage of development but have the potential to be implicated in therapy in various indications (12).

There is virtually no information about the GIP receptor expression in human primary tumors (7). Even the current knowledge of the GIP receptor expression in normal human tissues is incomplete. Much of our knowledge is based on receptor mRNA and immunohistochemical investigations in rat tissues (13–15). Only little information is available on the receptor pro-

tein expression, the exact tissue localization of the receptor, and receptor density levels in human organs. Therefore, the aim of the study was to assess the GIP receptor protein expression, first, in a broad spectrum of human tumors, predominantly gastrointestinal and bronchial tumors, and second, in normal human tissues considered common sites of tumor origin and metastasis, using *in vitro* receptor autoradiography. This method has several advantages over other techniques: it identifies receptor binding sites that represent the *in vivo* target structures, it allows assessing the binding affinity of the receptor, and it correlates with morphology and permits quantification of the receptor density (4). Moreover, the results of GIP receptor expression can be compared in the same tumors directly with the status of other peptide receptors, such as the somatostatin receptor and/or GLP-1 receptor, two receptors prominently expressed in endocrine gastroenteropancreatic tumors (5) and characterized by important clinical implications (1, 2).

Materials and Methods

Tissues

Fresh-frozen samples of tumor tissues obtained from surgical resection specimens and characterized previously for other peptide receptors (2, 5, 16–19) were used in this study (Table 1).

TABLE 1. GIP receptor incidence and density in human tumors: comparison with somatostatin receptors in NET

Tumor type	GIP receptor incidence	GIP receptor density (number of cases per density category)			SS-R incidence	SS-R density (number of cases per density category)		
		Low, <1000 dpm/mg	Moderate, 1000–3000 dpm/mg	High, >3000 dpm/mg		Low, <1000 dpm/mg	Moderate, 1000–3000 dpm/mg	High, >3000 dpm/mg
GI NET								
Ileal NET	18/21	0	3	15	18/21	1	4	13
Pancreatic NET								
Functional: insulinomas	39/39	9	14	16	20/39	3	2	15
Gastrinomas	9/9	0	0	9	8/9	0	0	8
Glucagonomas	4/4	1	1	2	3/4	0	1	2
Vipomas	4/4	1	0	3	4/4	0	0	4
Somatostatinomas	1/2	0	0	1	0/2	0	0	0
Nonfunctional	15/15	0	4	11	13/15	0	0	13
Bronchial NET	22/24	8	8	6	12/24	0	2	10
GI carcinomas								
Colorectal adenocarcinomas	0/9							
Gastric adenocarcinomas	1/12	1	0	0				
Pancreatic adenocarcinomas	5/19	4	0	1				
Cholangiocellular carcinomas	1/12	1	0	0				
Hepatocellular carcinomas	0/12							
Lung adenocarcinomas	0/10							
Varia								
GIST	0/12							
GI lymphomas	0/9							
SS-R-negative GEP and bronchial NET	39/44	7	18	14	0/44			
GLP-1 receptor-negative malignant insulinomas	4/4			4	4/4			4

dpm, Disintegrations per minute; GI, Gastrointestinal; SS-R, somatostatin receptors; GEP, gastroenteropancreatic.

TABLE 2. GIP receptor density in receptor-positive human nonneoplastic gastrointestinal tissues

Organ	GIP receptor incidence	GIP receptor density ^a
Pancreas		
Islets		
Organ condition		
Donor	4/4	563 ± 110
NET	18/18	801 ± 63
Pancreas carcinoma	15/15	1514 ± 123
Pancreatitis	7/7	1288 ± 487
Acini		
Organ condition		
Donor	0/4	
NET	0/18	
Pancreas carcinoma	0/15	
Pancreatitis	0/11	
Stomach	0/8	
Duodenum	0/6	
Ileum	0/9	
Colon	0/9	
Liver	0/12	
Gall bladder	1/6	
Lymph nodes	1/15	
Lung	2/11	

^a Mean ± SEM of receptor-positive cases (disintegrations per minute per milligram tissue).

Furthermore, nonneoplastic human tissues resected together with the tumor or adjacent to the tumor were also included (Table 2). The study conformed to the ethical guidelines of the Institute of Pathology, University of Bern, and was reviewed by the Institutional Review Board.

In vitro GIP receptor autoradiography

The *in vitro* GIP receptor autoradiography was carried out as described previously for the GLP-1 receptor (5, 20). The peptide analog used as radioligand was human GIP(1–30). It was radiolabeled by the lactoperoxidase method and purified by HPLC (Anawa, Wangen, Switzerland). The two iodotyrosine analogs (peak 1 iodinated at Tyr¹ and peak 2 iodinated at Tyr¹⁰) were analyzed by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (R. Brunisholz, Functional Genomics Center Zürich, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, Switzerland). The peak (2000 Ci/mmol) representing [¹²⁵I-Tyr¹⁰]GIP(1–30) was used in all experiments to keep intact the N-terminal end of GIP, which binds to the GIP receptor binding pocket (21). Twenty-micrometer-thick frozen tissue sections were incubated for 2 h at room temperature in the incubation solution containing 170 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2), 1% BSA, 40 μg/ml bacitracin, 10 mM MgCl₂, and 20,000 cpm/100 μl [¹²⁵I]GIP(1–30). Nonspecific binding was determined by incubating tissue sections in the incubation solution containing additionally 100 nM unlabeled human GIP (Bachem, Bubendorf, Switzerland), which, at this concentration, completely and specifically displaces [¹²⁵I]GIP(1–30) binding at the receptors. Additional pharmacological displacement experiments were performed to differentiate GIP receptors from other members of the glucagon receptor family. For this purpose, serial tissue sections were incubated with [¹²⁵I]GIP(1–30) together with increasing

concentrations of one of the following analogs: human GIP, the GLP-1 receptor-selective analog GLP-1 (Bachem), the GLP-2 receptor-selective analog GLP-2 (Bachem), or the glucagon receptor-selective analog glucagon(1–29) (Bachem). After incubation, the slides were washed five times in ice-cold Tris-HCl buffer (170 mM; pH 8.2) containing 0.25% BSA and twice in ice-cold Tris-HCl buffer without BSA. The slides were dried for 15 min under a stream of cold air and then exposed to Kodak films Biomax MR for 7 d at 4 C. The signals on the films were analyzed in correlation with morphology using corresponding hematoxylin- and eosin-stained tissue slides. The receptor density was quantitatively assessed using tissue standards for iodinated compounds (Amersham, Aylesbury, UK) and a computer-assisted image processing system (Analysis Imaging System; Interfocus, Mering, Germany).

In vitro GLP-1 and somatostatin receptor autoradiography

GLP-1 receptor expression was evaluated *in vitro* by GLP-1 receptor autoradiography as previously reported using [¹²⁵I]GLP-1(7–36)amide (74 Bq/mmol; Anawa) as radioligand in sections of patients' tumor samples (20). The *in vitro* autoradiography of somatostatin receptor expression was performed in consecutive sections of the same tumor using the somatostatin receptor subtype 2-preferring radioligand [¹²⁵I-Tyr³]octreotide as previously described (19).

GIP receptor mRNA identification by RT-PCR

Reverse transcription to cDNA was performed on 0.5 μg total RNA with SuperScript III (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) using oligo-deoxythymidine primers (Invitrogen). GIP receptor PCR was performed with 2.5 U Pfu Turbo DNA polymerase (Agilent Technology, Massy, France) in a 50-μl reaction volume. PCR was initiated by a denaturation step for 1 min at 95 C, followed by 35 cycles consisting of 30 sec at 95 C, 1 min at 63 C, and 2 min at 68 C. A final extension was performed for 10 min at 68 C. Actin PCR was performed with 2.5 U Pfu Turbo DNA polymerase (Agilent Technology) in a 50-μL reaction volume. PCR was initiated by a denaturation step for 5 min at 95 C, followed by 25 cycles consisting of 1 min at 95 C, 1 min at 53 C, and 1 min 30 sec at 72 C. A final extension was performed 5 min at 72 C. The PCR products were fractionated on 1.5% agarose gel and visualized with ethidium bromide.

Primers sequences were 5'-aac acg cag tgc tgg gag c-3' (sense), 5'-gga gct ggc gtt gct cct cg-3' (antisense) for GIP receptor, 5'-gct cgt cgt cga caa cgg ct-3' (sense), and 5'-caa aca tga tct tct ggg tca tct tct c-3' (antisense) for actin.

Results

GIP receptor expression in human tumors

The GIP receptor expression was assessed in a broad spectrum of human gastrointestinal and bronchial tumors listed in Table 1. Table 1 also summarizes the GIP receptor incidences and densities in these tumors. It shows that a high GIP receptor expression was found in NET. Of these tumors, functional pancreatic NET, including insulinomas, gastrinomas, glucagonomas, and vipomas, as well as nonfunctional pancreatic NET, ileal NET, and bronchial NET are especially noteworthy. Representative examples

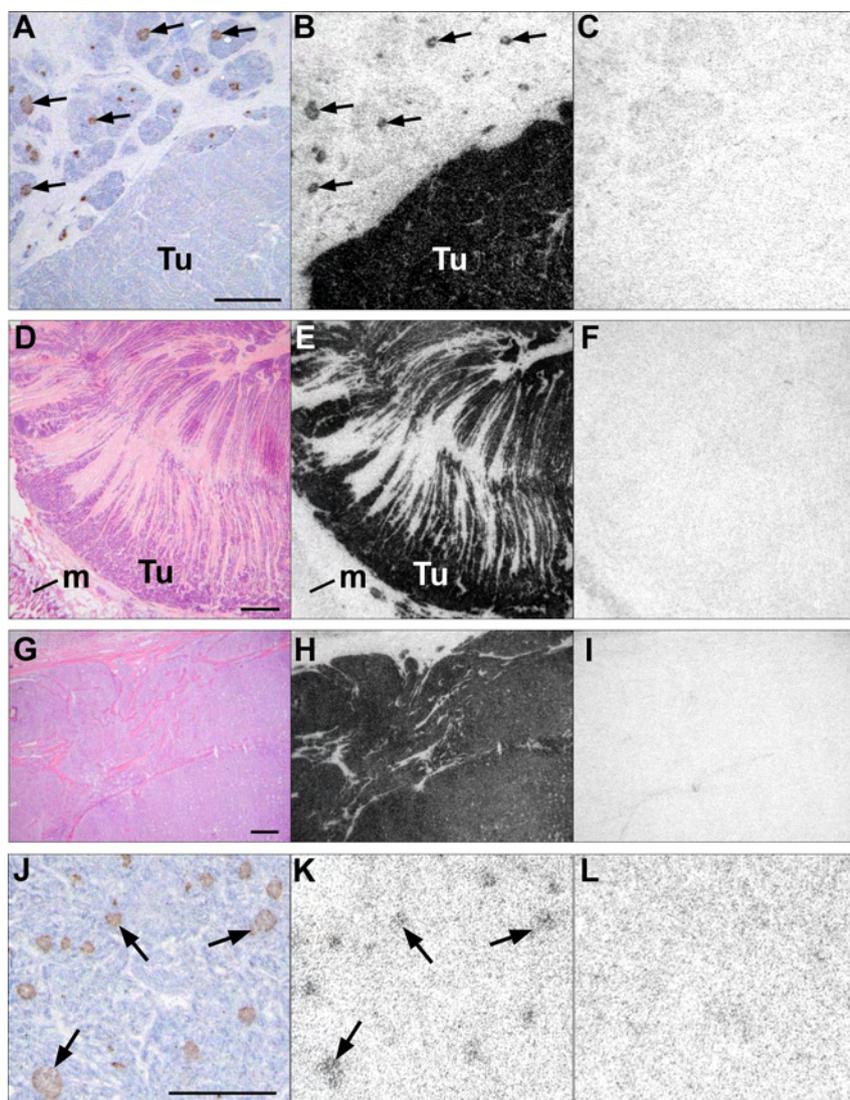


FIG. 1. A–I, GIP-R in a pancreatic NET (A–C), an ileal NET (D–F), and a bronchial NET (G–I); A, section with insulin immunohistochemical staining (*bar*, 1 mm; *arrows* indicate pancreatic islets; Tu, tumor); B, autoradiogram showing total binding of [¹²⁵I]GIP; C, autoradiogram showing binding of [¹²⁵I]GIP in presence of 10^{-6} M GIP (nonspecific binding); D and G, hematoxylin- and eosin-stained sections (*bars*, 1 mm; *m*, mucosa; Tu, tumor); E and H, autoradiograms showing total binding of [¹²⁵I]GIP; F and I, autoradiograms showing nonspecific binding. All three tumors are strongly expressing GIP receptors. Islets in adjacent pancreas in A are also GIP receptor positive (B), whereas ileal mucosa in D is receptor negative (E). J–L, GIP receptors in islets of normal pancreas; J, insulin immunohistochemistry (*bar*, 1 mm; *arrows* indicate pancreatic islets); K, autoradiogram showing total binding of [¹²⁵I]GIP; L, autoradiogram showing nonspecific binding.

are shown in Fig. 1. Remarkable is not only the high receptor density but also the homogeneous receptor distribution in both tumors. Of particular interest is the GIP receptor overexpression in the majority (88%) of somatostatin receptor-negative NET, which consisted of gastrointestinal and bronchial NET and also in most GLP-1 receptor-negative malignant insulinomas (Table 1 and Fig. 2).

Conversely, among the epithelial cancers, GIP receptors were rarely found (Table). The highest incidence of GIP receptor expression, approximately 26%, was found

in pancreatic tumors. This occasional GIP receptor expression was found both in pancreatic intraductal neoplasia and in invasive carcinoma; the only case with a high density of GIP receptors was a pancreatic intraductal neoplasia. GIP receptors were not detected in colonic adenocarcinomas, hepatocellular carcinomas, gastrointestinal stromal tumors (GIST), gut lymphomas, or lung adenocarcinomas and were rarely detected in gastric adenocarcinomas and cholangiocarcinomas (Table 1).

GIP receptor expression in nonneoplastic human tissues

GIP receptors were also investigated in a variety of nonneoplastic human tissues, originating mainly from of the gastrointestinal tract. They were found only in a few specific organs and in specific tissue compartments, which are summarized in Table 2. Of particular relevance, because they are physiologically functional, are the GIP receptors in pancreatic islets. They are detected in comparable amounts in islets of donor pancreas and of pancreas from NET patients (Fig. 1). They are also expressed in islets of pancreas from chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma patients, however, with a trend of higher receptor density (Table 2). Of note, the acini in the pancreas do not express GIP receptors in any of the patient categories (Fig. 1 and Table 2). No GIP receptors were found in the following tissues: stomach, duodenum, ileum, colon, or liver and rarely in gallbladder, lymph nodes, or lung.

Pharmacological characterization of GIP receptors

To ensure that the radioligand [¹²⁵I]GIP(1–30) was specifically bound by GIP receptors in the autoradiography experiments, pharmacological characterization was performed using [¹²⁵I]GIP(1–30) in competition binding assays with increasing concentrations of unlabeled GIP(1–30), human GIP, the GLP-1 receptor-selective agonist GLP-1, the GLP-2 receptor-selective agonist GLP-2, or the glucagon receptor-selective agonist glucagon(1–29). Representative results for a tumor and normal pancreatic islets

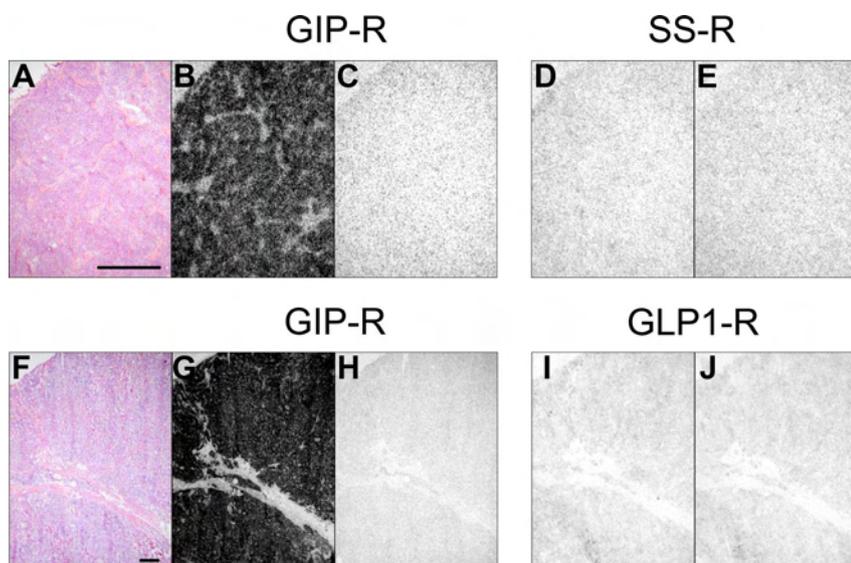


FIG. 2. A–E, A GIP receptor-positive but somatostatin receptor (SS-R)-negative benign insulinoma; F–J, a GIP receptor-positive but GLP-1 receptor-negative malignant insulinoma; A and F, hematoxylin- and eosin-stained sections (bars, 1 mm); B and G, autoradiograms showing total binding of [¹²⁵I]GIP; C and H, autoradiograms showing nonspecific binding of [¹²⁵I]GIP; D, autoradiogram showing total binding of [¹²⁵I-Tyr³]octreotide; E, autoradiogram showing nonspecific binding; I, autoradiogram showing total binding of [¹²⁵I]GLP-1; J, autoradiogram showing nonspecific binding.

are shown in Fig. 3. In all examples, [¹²⁵I]GIP(1–30) binding is inhibited by GIP(1–30) and GIP with high affinity in the nanomolar concentration range, whereas it is not inhibited by GLP-1, GLP-2, and glucagon(1–29). This rank

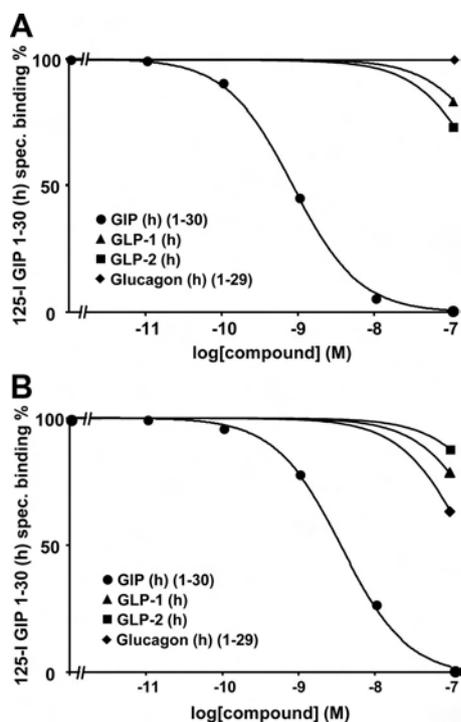


FIG. 3. Competition experiments in subsequent sections of tissues consisting of a pancreatic NET (vipoma) (A) and normal pancreatic islets (B). Human GIP(1–30) displaces with high affinity the [¹²⁵I]GIP radioligand, whereas GLP-1, GLP-2, and glucagon(1–29) displace it with low affinity.

order of potencies provides strong pharmacological evidence that GIP receptors are specifically identified.

GIP receptor mRNA analysis by PCR

A single band of 424 bp corresponding to the GIP receptor transcript was found in each of the GIP receptor-expressing ileal and pancreatic NET, including insulinomas. GIP receptor-negative (by receptor autoradiography) tissues such as liver and colon carcinoma did not show the corresponding band (Fig. 4).

Discussion

This report on GIP receptor protein expression in a large spectrum of human gastrointestinal and bronchial tumors as well as adjacent normal human tissues shows, for the first time, that GIP receptors are massively overexpressed in specific NET. It represents a significant extension of current knowledge on the tumoral and physiological expression of gut hormone receptors in human tissues in general. Whereas the GIP receptors are overexpressed in NET, they are virtually absent in gastrointestinal and lung carcinomas, GIST, and gut lymphomas. An impressive GIP receptor expression is found not only in functional pancreatic NET, such as insulinomas and gastrinomas (5), as well as nonfunctional pancreatic NET and ileal NET, but also in most bronchial NET, characterized by both a very high receptor incidence and density. The high receptor content in NET contrasts with the low physiological GIP receptor expression in corresponding healthy human tissues, with only few gastrointestinal tissues showing measurable receptor amounts, primarily the islets of the pancreas, where GIP exerts its main physiological action.

Strong proof for the identification of specific GIP receptors in tumors and physiological target tissues is not only given by the clear pharmacological binding behavior of the receptors in the autoradiography study in both tumoral and physiological GIP target tissues but also by the results at the mRNA level using RT-PCR technology in the same tissues.

It has previously been shown that a large percentage of neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors express receptors for another gut peptide, somatostatin. The somatostatin receptors have been reported in the majority of

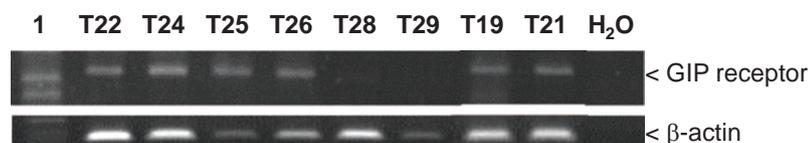


FIG. 4. RT-PCR of GIP receptors in NET. T22, T24, T25, T26, T19, and T21 are all GIP receptor-positive tumors (T22, T19, and T21 are benign insulinomas; T24 is a bronchial NET; T25 is a malignant insulinoma; and T26 is a pancreatic NET) as confirmed by receptor autoradiography; T28 and T29 are GIP receptor-negative tissues (T28 is a colon adenocarcinoma; T29 is liver). Lane 1, DNA ladders (396 and 344 bp are shown). *Top*, GIP receptors; *bottom*, β -actin.

well-differentiated pancreatic NET and in virtually all gastrinomas, however, to a much lesser extent in insulinomas and undifferentiated NET (5). They have been found more rarely in bronchial than in gut NET. These receptors have been the basis for *in vivo* somatostatin receptor targeting of NET (1); the use of this technique has considerably changed and improved the clinical strategy in the respective patients. Unfortunately, patients bearing tumors belonging to the minority of NET that are lacking somatostatin receptors cannot benefit from imaging or targeted radiotherapy. A most significant result of our study that compared GIP receptor expression with somatostatin receptor expression in all NET is therefore that GIP receptor incidence compared advantageously with the incidence of somatostatin receptor expression in this particular group of gastroenteropancreatic and bronchial NET. The fact that somatostatin receptor-negative tumors retain the GIP receptors may possibly be of clinical significance; GIP receptor imaging may be developed that may replace or complement somatostatin receptor imaging in these tumors. Particularly interesting cases are the insulinomas; GIP receptors are expressed not only in all benign insulinomas, including the somatostatin receptor-negative ones but also in malignant insulinomas, known to often lack another gut peptide receptor, the GLP-1 receptor (22). As such, GIP receptor imaging may be a universal marker for NET. The GIP receptor containing NET could represent prospective candidates for an *in vivo* targeting for imaging and therapy analogous to the somatostatin receptor targeting.

The generally low physiological GIP receptor expression in human GI tract and lung, as well as in common sites of metastases such as lymph nodes or liver, represents a favorable circumstance for a GIP receptor tumor imaging. Indeed, a high tumor-to-background (*i.e.* nonneoplastic surrounding tissues) ratio is an essential prerequisite for sensitive and specific tumor detection with receptor-targeted scintigraphy. GIP receptors were detected in measurable amounts in only selected normal gastrointestinal tissue compartments, such as islets of the pancreas. Similar amounts of GIP receptors are expressed in the pancreatic islets from donor pancreas or NET-bearing pancreas. In-

terestingly, but difficult to explain, is the trend of higher GIP receptor expression in pancreatic islets from evidently altered pancreas, such as pancreatitis or pancreatic adenocarcinomas. Furthermore, of particular importance is the observation that the pancreatic acini completely lack GIP receptors in all tested pancreatic conditions. This is a difference from the GLP-1 receptors that have been shown to be expressed both in islets and acini. Knowing that some inves-

tigators have suggested the GLP-1 receptor as a potential target for β -cell mass imaging (23, 24), our results suggest that it may be attractive, alternatively, to use the other incretin receptor, namely the GIP receptor, as a target for β -cell mass imaging, because it targets only the β -cell in the pancreas. However, owing to the poor incretin effect of GIP in diabetic patients (9, 10, 25), it will be interesting to determine *in vivo* whether and to which extent GIP receptors are expressed in the islets of such patients, compared with nondiabetic controls.

In conclusion, the high GIP receptor expression in specific NET and low expression in normal tissues represent the molecular basis for an *in vivo* NET targeting for diagnostic and therapeutic purposes. Although this is true for those tumors expressing solely GIP receptors, the frequent concomitant expression of GIP receptors with somatostatin receptors and even GLP-1 receptors in many NET suggest also the possibility of multiple receptor targeting of the respective tumors; injections of a cocktail of established radiolabeled somatostatin analogs (26) and GLP-1 analogs (2, 3), together with putative GIP analogs may be an attractive possibility for an extremely potent tumor imaging and targeted radiotherapy. Stable and adequately labeled GIP analogs suitable for nuclear medicine applications should therefore be developed.

Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: Jean Claude Reubi, M.D., University of Berne, Institute of Pathology, Division of Cell Biology and Experimental Cancer Research, P.O. Box 62, Murtenstrasse 31, CH-3010 Berne, Switzerland. E-mail: reubi@pathology.unibe.ch.

Disclosure Summary: The authors have no conflict of interest to disclose.

References

- Oberg KE, Reubi JC, Kwakkeboom DJ, Krenning EP 2010 Role of somatostatins in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor development and therapy. *Gastroenterology* 139:742–753, 753e1

2. Christ E, Wild D, Forrer F, Brändle M, Sahli R, Clerici T, Gloor B, Martius F, Maecke H, Reubi JC 2009 Glucagon-like peptide-1 receptor imaging for localization of insulinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 94:4398–4405
3. Wild D, Mäcke H, Christ E, Gloor B, Reubi JC 2008 Glucagon-like peptide 1-receptor scans to localize occult insulinomas. *N Engl J Med* 359:766–768
4. Reubi JC 2003 Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr Rev* 24:389–427
5. Reubi JC, Waser B 2003 Concomitant expression of several peptide receptors in neuroendocrine tumors as molecular basis for in vivo multireceptor tumor targeting. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30:781–793
6. Mayo KE, Miller LJ, Bataille D, Dalle S, Göke B, Thorens B, Drucker DJ 2003 International Union of Pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family. *Pharmacol Rev* 55:167–194
7. McIntosh CH, Widenmaier S, Kim SJ 2009 Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (gastric inhibitory polypeptide; GIP). *Vitam Horm* 80:409–471
8. Asmar M, Holst JJ 2010 Glucagon-like peptide 1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide: new advances. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 17:57–62
9. Holst JJ, Vilsbøll T, Deacon CF 2009 The incretin system and its role in type 2 diabetes mellitus. *Mol Cell Endocrinol* 297:127–136
10. Ahrén B 2009 Islet G protein-coupled receptors as potential targets for treatment of type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 8:369–385
11. Knop FK, Vilsbøll T, Holst JJ 2009 Incretin-based therapy of type 2 diabetes mellitus. *Curr Protein Pept Sci* 10:46–55
12. Tharakan G, Tan T, Bloom S 2011 Emerging therapies in the treatment of ‘diabesity’: beyond GLP-1. *Trends Pharmacol Sci* 32:8–15
13. Yip RG, Wolfe MM 2000 GIP biology and fat metabolism. *Life Sci* 66:91–103
14. Nyberg J, Jacobsson C, Anderson MF, Eriksson PS 2007 Immunohistochemical distribution of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in the adult rat brain. *J Neurosci Res* 85:2099–2119
15. Usdin TB, Mezey E, Button DC, Brownstein MJ, Bonner TI 1993 Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology* 133:2861–2870
16. Körner M, Hayes GM, Rehmann R, Zimmermann A, Scholz A, Wiedenmann B, Müller LJ, Reubi JC 2006 Secretin receptors in the human liver: Expression in biliary tract and cholangiocarcinoma, but not in hepatocytes or hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 45:825–835
17. Reubi JC, Körner M, Waser B, Mazzucchelli L, Guillou L 2004 High expression of peptide receptors as a novel target in gastrointestinal stromal tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31:803–810
18. Reubi JC, Läderach U, Waser B, Gebbers JO, Robberecht P, Laissue JA 2000 Vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor subtypes in human tumors and their tissues of origin. *Cancer Res* 60:3105–3112
19. Reubi JC, Kvols LK, Waser B, Nagorney DM, Heitz PU, Charbonneau JW, Reading CC, Moertel C 1990 Detection of somatostatin receptors in surgical and percutaneous needle biopsy samples of carcinoids and islet cell carcinomas. *Cancer Res* 50:5969–5977
20. Körner M, Stöckli M, Waser B, Reubi JC 2007 GLP-1 receptor expression in human tumors and human normal tissues: potential for in vivo targeting. *J Nucl Med* 48:736–743
21. Yaqub T, Tikhonova IG, Lättig J, Magnan R, Laval M, Escricut C, Boulègue C, Hewage C, Fourmy D 2010 Identification of determinants of glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor that interact with N-terminal biologically active region of the natural ligand. *Mol Pharmacol* 77:547–558
22. Wild D, Christ E, Caplin ME, Kurzawinski TR, Forrer F, Brändle M, Seufert J, Weber WA, Bomanji J, Perren A, Ell PJ, Reubi JC 2011 Glucagon-like peptide-1 vs. somatostatin receptor targeting in malignant insulinomas. *J Nucl Med* 52:1073–1078
23. Brom M, Andraofojæ K, Oyen WJ, Boerman OC, Gotthardt M 2010 Development of radiotracers for the determination of the β -cell mass in vivo. *Curr Pharm Des* 16:1561–1567
24. Wu Z, Kandeel F 2010 Radionuclide probes for molecular imaging of pancreatic β -cells. *Adv Drug Deliv Rev* 62:1125–1138
25. Holst JJ, Knop FK, Vilsbøll T, Krarup T, Madsbad S 2011 Loss of incretin effect is a specific, important, and early characteristic of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 34(Suppl 2):S251–S257
26. Reubi JC, Maecke HR 2008 Peptide-based probes for cancer imaging. *J Nucl Med* 49:1735–1738

DISCUSSION

L'objectif de cette étude était d'évaluer le potentiel du RGIP en tant que cible pharmacologique pour la détection des tumeurs neuroendocrines, comparativement à l'expression des récepteurs de la somatostatine et du GLP-1.

Pour la première fois, nous avons montré que le récepteur GIP était exprimé dans les cancers, avec une forte densité dans la majorité des tumeurs neuroendocrines pancréatiques, bronchiques et iléales. En particulier, il a été détecté dans la totalité des insulinomes, y compris les insulinomes malins, connus pour être négatifs pour le récepteur GLP-1. De plus, l'expression du RGIP est homogène dans les tissus tumoraux et faible dans les tissus sains. Le récepteur GIP remplit donc les critères pour une application clinique dans le cadre de la scintigraphie ciblée. Pour cela, le développement d'analogues radiomarqués stables et spécifiques du RGIP est nécessaire.

D'autre part, il serait intéressant de définir le rôle du RGIP dans les tumeurs. En effet, le GIP est connu pour stimuler la prolifération, la différenciation et la survie des cellules β [361]. On peut donc envisager que ce récepteur soit impliqué dans les processus tumoraux. Par ailleurs, un variant d'épissage du RGIP aboutissant à la synthèse d'une protéine tronquée a été décrit comme exerçant des effets similaires à ceux du $\Delta E2$ -CCK2R sur la régulation de l'expression membranaire de la forme sauvage [348]. Identifié à partir d'îlots de pancréas de souris et de rat, il est possible que ce variant soit également exprimé dans les tumeurs. Il faudrait vérifier cela avec des primers adaptés à sa détection.

ARTICLE III

Nanoconjugaison of gastrin to magnetic nanoparticles enables targeting of cholecystokinin-2 receptor positive cells and receptor-mediated uptake

INTRODUCTION

La surexpression des RCPG dans les tumeurs neuroendocrines a permis la mise en place d'une nouvelle approche thérapeutique, basée sur l'utilisation de radio-ligands. L'exemple le plus probant est celui du récepteur de la somatostatine, qui a conduit au développement de l'Octreoscan[®], un analogue radioactif de la somatostatine couramment utilisé en clinique pour le diagnostic des tumeurs neuroendocrines [11]. Le récepteur CCK2 est une autre cible potentielle des radio-ligands, notamment pour la détection des carcinomes médullaires de la thyroïde qui expriment peu le récepteur de la somatostatine. Des analogues de gastrine et de CCK sont actuellement en cours d'évaluations cliniques [159].

L'émergence des nanotechnologies a ouvert une nouvelle ère dans le diagnostic et la thérapie anti-cancéreuse. Les nanoparticules magnétiques sont actuellement utilisées comme agent de contraste pour améliorer la sensibilité de la détection en IRM. De plus, leurs propriétés magnétiques permettent l'utilisation des nanoparticules en tant que vecteurs pour la thérapie par hyperthermie [205]. Lorsqu'elles sont injectées chez les patients, les nanoparticules magnétiques sont captées par les cellules immunitaires du système réticulo-endothélial (RES), et s'accumulent dans le foie et la rate. Elles sont donc utilisées pour le diagnostic des pathologies associées à ces organes. La détection de cancers qui affectent d'autres organes requiert la vectorisation des nanoparticules, qui consiste à rajouter à leur surface un ligand ou un anticorps dont la cible est surexprimée dans le tissu d'intérêt.

Dans ce contexte, nous avons choisi de vectoriser des nanoparticules magnétiques avec la gastrine, afin de cibler les cellules cancéreuses qui surexpriment le récepteur CCK2. La gastrine présente l'avantage d'être spécifique du RCCK2, alors que la CCK lie les sous-types RCCK1 et RCCK2 avec des affinités similaires. Cependant, les analogues radiomarqués de gastrine ont montré une rétention rénale élevée, entraînant un risque de néphrotoxicité. Ce phénomène est lié à la présence de 5 acides glutamiques dans la séquence de la gastrine. C'est pourquoi nous avons fait synthétiser une gastrine dépourvue de cette séquence (MG10), mais qui conserve les 6 acides aminés de la portion N-terminale indispensables à la liaison et l'activité biologique du peptide sur le RCCK2.

D'autre part, le couplage des nanoparticules avec la gastrine est susceptible de modifier l'interaction du peptide avec son récepteur, et d'entraîner des perturbations dans l'activation et le trafic intracellulaire de celui-ci. Notre équipe ayant récemment caractérisé les

mécanismes d'internalisation du RCCK2, nous avons étudié l'impact des nanoparticules sur l'endocytose du récepteur et son devenir intracellulaire. Nous avons montré précédemment que le RCCK2 était internalisé par la voie dépendante de la clathrine suite au recrutement des β -arrestines 1 et 2 [100]. Aucune différence n'a été observée entre la gastrine et la CCK, qui sont internalisées avec le récepteur. Ceci est important pour l'accumulation intracellulaire des nanoparticules vectorisées avec la gastrine. De plus, le RCCK2 n'est pas recyclé rapidement, et le ligand reste dans la cellule sur des temps longs. Il est probable qu'il soit ensuite dégradé dans les lysosomes, puisque la majorité des récepteurs est adressée à ce compartiment. Il existe actuellement peu de données concernant les mécanismes d'entrée des nanoparticules vectorisées dans les cellules, c'est pourquoi il nous est apparu important de comparer nos résultats avec les données précédemment obtenues sur l'internalisation du RCCK2. Pour cela, nous avons utilisé le même système cellulaire, c'est-à-dire la lignée HEK-FlpIn qui est un modèle reconnu pour l'étude des mécanismes d'internalisation.

De plus, l'internalisation et la localisation intracellulaire des nanoparticules vectorisées avec la gastrine ont été vérifiées sur la lignée tumorale endocrine INR1G9 qui a été transfectée de manière stable avec le RCCK2 [362]. Ces cellules ont également été transplantées chez la souris nude afin d'obtenir des tumeurs qui surexpriment le RCCK2. La capacité de ciblage des nanoparticules a été déterminée suite à leur injection intra-veineuse chez ces souris, grâce à la détection du fer par la coloration au Bleu de Prusse sur les coupes histologiques.

Enfin, notre travail a montré que les nanoparticules s'accumulaient de façon durable dans les lysosomes, ce qui est favorable à l'application d'un traitement par hyperthermie. En effet, des études rapportent que l'hyperthermie perturbe l'intégrité de la membrane des lysosomes [363, 364]. Or la fuite du contenu des lysosomes dans le cytoplasme est décrite comme étant un mécanisme responsable de la mort cellulaire par voie lysosomiale. Un intérêt particulier a été porté sur cette voie, car la mort cellulaire par apoptose est fréquemment déficiente dans les cellules cancéreuses, suite à l'apparition de mutations inactivatrices des protéines pro-apoptotiques ou la surexpression de protéines anti-apoptotiques [365, 366]. Les effets cytotoxiques du traitement par hyperthermie ont été étudiés sur les cellules INR1G9-RCCK2 chargées en nanoparticules et soumises à un champ magnétique alternatif. La mort cellulaire a été quantifiée par le marquage des cellules avec de l'iodure de propidium et de l'annexine V fusionnée au FITC (isothiocyanate de fluorescéine). La fuite du contenu lysosomal a été déterminée grâce à l'acridine orange, qui est une sonde fluorescente lysosomotropique sensible au pH. A pH acide (lysosomes), l'acridine orange émet dans le

rouge, alors qu'à pH basique (cytoplasme) elle émet dans le vert. Ce composé permet donc d'étudier la perméabilisation de la membrane lysosomiale [367].

Avertissement : L'article qui suit est une version qui ne sera soumise que lorsque nous aurons intégré de nouveaux résultats pour la partie *in vivo*.

Nanoconjugation of gastrin to magnetic nanoparticles enables targeting of tumoral cells expressing cholecystokinin-2 receptor and receptor-mediated uptake

Claire Sanchez¹, Pascal Clerc¹, Darine El Hajj Diab¹, Chantal Escrieut¹, Etienne Meunier², Denis Calise³, Bernard Pipy², Bruno Payré⁴, Vincent Connord⁵, Julian Carrey⁵, Véronique Gigoux¹ and Daniel Fourmy¹

¹ Université de Toulouse 3, EA 4552, Toulouse, France

² Université de Toulouse 3, EA2405, Toulouse, France

³ Service de Microchirurgie Anexplo-US006, Toulouse, France

⁴ Université de Toulouse 3, Faculté de Médecine, Centre de Microscopie Électronique Appliquée à la Biologie, Toulouse, France

⁵ INSA/CNRS, Laboratoire de Physique et Chimie des Nano-Objets, Toulouse

Abstract

The iron oxide magnetic nanoparticle has emerged as a potential multifunctional clinical tool that can provide cancer cell detection by magnetic resonance imaging (MRI) contrast enhancement as well as targeted cancer cell therapy. However, our knowledge about how engineering of targeted iron oxide nanoparticles influences their ability to efficiently cross all natural barriers before they concentrate in tumors still deserves serious investigations in adequate models of cancers. Furthermore, uptake mechanism of targeted iron oxide nanoparticles by cancer cells and their intracellular fate still remains poorly documented, although these data are essential for setting-up efficient anti-cancer therapeutic strategies. Our aim in this study, was to design an hybrid system (termed MG10-IONP-DY647) composed of an iron oxide nanocrystal decorated with a peptidic ligand of the cholecystokinin-2 receptor (CCK2R) that is overexpressed in several types of human malignant tumors and to study its ability to target cells expressing CCK2R *in vitro* and *in vivo*. We showed that MG10-IONP-DY647 recognize cells expressing the CCK2R with a satisfactory specificity *in vitro* and, once bound to CCK2R, internalize via a mechanism involving recruitment of β -arrestins, clathrin-coated pits and dynamin and are directed to lysosomes. However, trafficking of CCK2R internalized following binding of nanoparticles is slightly modified in comparison to CCK2R internalized in the presence of unconjugated ligand. When injected to animals bearing tumors grown from tumoral endocrine cells expressing the CCK2R, they did not accumulate in the tumor due to expression of the CCK2R but rather reach the tumor via EPR mechanism. The high amount of nanoparticles found in the spleen and in the liver as well as quick and abundant uptake of nanoparticles by macrophages supported a predominance of nanoparticle capture by resident and circulating macrophages *in vivo*. Interestingly, even at high concentrations, nanoparticles did not stimulate inflammasome. Investigations aimed at optimization of the density of gastrin molecules at the surface of the nanoparticles and their surface physico-chemical properties are in progress.

Introduction

Despite continuous improvement in delivery systems, the development of methods for efficient and specific delivery of targeted diagnostic and therapeutic agents to tumors still remains a timely and considerable challenge. The two important pre-requisites for targeted delivery of such agents are: - the availability of biological targets selectively expressed, or at least over-expressed, in tumors relative to normal surrounding and distant tissues, and; - the availability of biocompatible systems which, once injected to patients will concentrate in the primary tumor and metastases but not in other organs, and subsequently enable destruction of the tumor.

In the recent years, magnetic nanoparticles have emerged as a potential clinical tool in oncology (1, 2). Indeed, magnetic nanoparticles can serve as imaging probes for cancer cell detection by magnetic resonance imaging (MRI) contrast enhancement. Moreover, like other nanomaterials, magnetic nanoparticles offer the theoretical potential of being a vehicle to carry therapeutic agents through the body and subsequently enable their selective delivery to primary tumors and their metastases. Finally, magnetic nanoparticles are endowed of an ability to cause local hyperthermia upon application of an alternating magnetic field (1, 2).

Iron oxide nanoparticles (IONP) meet most of the criteria requested for targeted cancer diagnosis and therapy. Iron oxide nanoparticles having 10-20 nm size are able to generate significant transverse T2 relaxation time shortening and susceptibility effects resulting in strong T2-weighted contrast on MRI (3, 4). One second major advantage of iron nanoparticles over other magnetic nanoparticles is their established tissue biocompatibility and low toxicity in humans (4). Thus, several formulations of iron oxide nanoparticles have been developed for magnetic resonance imaging (MRI) contrast enhancement (4) and thermotherapy of cancers (5, 6). However, despite these important opportunities, our knowledge about how engineering of targeted iron oxide nanoparticles influences their ability to efficiently escape from the reticuloendothelial system, undergo extravascular transport to cancer cells and finally concentrate in tumors still deserves serious investigations in adequate models of cancers. Furthermore, uptake mechanism of targeted iron oxide nanoparticles by cancer cells and their intracellular fate still remains poorly

documented, although these data are essential for setting-up efficient anti-cancer therapeutic strategies.

In this context, our aim in the study presented here was to design an hybrid system composed of an iron oxide nanocrystal decorated with a peptidic ligand of the cholecystokinin-2 receptor (CCK2R) that is overexpressed in human malignant tumors (7, 8). The CCK2R was chosen as an example of target receptor because this seven-transmembrane domain peptide receptor is frequently expressed at high incidence and density in cancers such as medullary thyroid carcinomas, small cell lung cancers (SCLC), gastrointestinal stromal tumors (GIST), and insulinomas (9-11). Natural ligands of the CCK2R are two structurally related peptides, gastrin and CCK, which are produced in neuronal and endocrine cells (12). In the recent period, a number of radio-labeled replicates of CCK or gastrin have been developed, with the indication of receptor targeted tumor imaging and therapy, on the example of imaging probes which are currently used in clinic to detect neuroendocrine tumors over-expressing somatostatin receptors (13, 14). However, so far, none of these CCK or gastrin radiolabels has been approved for clinical use as their renal retention and expected radio-toxicity remains a major drawback.

This led us to design a hybrid system (termed MG10-IONP-DY647) composed of an iron oxide nanocrystal decorated with a peptidic ligand of the cholecystokinin-2 receptor (CCK2R) that is overexpressed in several types human malignant tumors and to study its ability to target cells expressing CCK2R in vitro and in vivo.

Materials and Methods

Chemical and biological materials.

Iron oxide nanoparticles were purchased from Genovis (Lund, Sweeden). Their characteristics provided by the manufacturer are given in table 1. Stable replicate of CCK, sulfated [Thr28,Nle31]-CCK 25-33 was synthesized as described previously (15) and is referred to as CCK. ¹²⁵I-Sodium (2000 Ci/mmol) and [myo-³H]inositol (5 μCi/ml) were from GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). CCK was conjugated with Bolton-Hunter reagent, purified, and radioiodinated as described previously (16) and is referred to as ¹²⁵I-CCK. MG10 was synthesized by Genepep (Montpellier, France). DY647 labeled CCK was obtained according to the procedure

described recently for Glucose Insulinotropic Polypeptide by coupling CCK to NHS-DY647 (Dyomics GmbH, Jena, Germany) and was referred to as CCK-DY647 (17). Succinimidyl-[(N-maleimidopropionamido)-octaethyleneglycol] ester [(SM (PEG)₈] and 3,3'-Dithiobis(sulfosuccinimidylpropionate [DTSSP] (Thermo Scientific), magnetic columns (Miltenyi, Berisch, Gladback, Germany), specific inhibitor of dynamin, dynasore (Calbiochem), an inhibitor of clathrin dependent uptake, chlorpromazine (Sigma-Aldrich), an inhibitor of caveoles, filipin (Sigma) were also used. The cDNAs encoding CCK2R was subcloning in pcDNA3 vector, and green fluorescent protein (GFP) tagged CCK2R was generated by subcloning the CCK2R cDNA in pEGFP-N1 (BD biosciences clontech). DsRed tagged Rab11, DsRed tagged Rab7 and clathrin-LCa-eYFP were obtained from Addgene (www.addgene.org). GFP tagged β -arrestin2 was kindly given by Robert Lefkowitz (Duke University Medical Center, Durham, USA). The cell lines were: HEK 293 cells stably expressing the CCK2R (Flp-InTM CCK2R-293) obtained using the Flp-InTM system (HEK293) (Invitrogen) as previously described (18); the glucagon-producing hamster tumoral cell line InR1G9 stably expressing CCK2R obtained as previously described (INR1G9-CCK2R) (19); RAW 264.7 Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line.

Preparation of gastrin-decorated magnetic nanoparticles (MG10-IONP-DY647)

A free sulfide group was introduced to MG10 N-terminus by coupling MG10 (2 mg) to DTSSP (6 mg) in borate sodium buffer 0.1 M pH: 8.5 overnight at room temperature. Then, the disulfide bridge in the reaction product was reduced in the presence of dithiothreitol 0.5 M at 37°C for 2 h. MG10-SH was H PLC purified on a C-18 column using trifluoroacetic acid 0.05% / acetonitrile gradient and was dried by lyophilisation. IONP were simultaneously activated with maleimide and labeled with DY647 by addition of 5 μ l of 38 mM SM(PEG)₈ solution in dimethyl sulfoxide and 12 μ l of 13 mM NHS-DY647 solution to IONP suspension composed of 80 μ l IONP stock solution (12 mg/ml) plus 120 μ l of 0.2 M sodium phosphate buffer, pH: 8.3, 150 mM NaCl. Reaction was carried out for 45 min at room temperature (RT). IONP were purified and recovered through a magnet column in phosphate saline buffer. IONP were then decorated with MG10 by incubating 200 μ l of maleimide-activated DY647-labeled IONP with 10 μ g of MG10-SH in solution in 300 μ l H₂O/dimethylsulfoxide (70/30) for 2 h at RT. Remaining free amino groups from IONP were neutralized by

addition of 50 µl of 12 mM cysteine solution in phosphate saline buffer and incubation for 30 min at RT. MG10-IONP were purified and recovered on a magnet column in 480 µl of 150 mM NaCl solution. MG10-IONP-DY647 were kept at 4°C until use. Before use, MG10-IONP-DY647 were sonicated in an ultrason cuve (Bioblock Scientific 88154) on ice for 10 min.

Cell culture

Flp-InTM CCK2R-293 and HEK293 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% FBS and 1% Penicillin-Streptomycin (Invitrogen). InR1G9 cells were cultured in RPMI 1640 with Glutamax-I containing 10% FBS and 1% Penicillin-Streptomycin (Invitrogen). Raws cells were cultured in RPMI 1640, supplemented with 10 % SVF (Eurobio) and 1% Penicillin-Streptomycin. Cell lines were cultured in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

Mouse peritoneal macrophage isolation

Resident peritoneal cells were harvested by washing the peritoneal cavity of Swiss mice (female, 4-6 weeks old) with sterile NaCl 0,9%. Collected cells were centrifuged and the cell pellet was suspended in Macrophage-Serum Free Medium (M-SFM) (Gibco Invitrogen). Cells were allowed to adhere for 2 h at 37°C, 5% CO₂. Non-adherent cells were then removed by washing with PBS.

Receptor binding and inositol phosphate assays

Cells were plated onto 24-well plates. After overnight growth binding assays were performed using ¹²⁵I-CCK according to the protocol previously described in detail (20). IC₅₀ were calculated from homologous ¹²⁵I-CCK competition binding experiments using the non-linear curve fitting software GraphPad Prism (San Diego, CA). For Inositol Phosphate Production determinations, approximately 24 hours after transfer to 24-well plates and after overnight incubation in DMEM containing 2 µCi/ml of myo-[2-³H]inositol (specific activity: 10–25 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences), Inositol phosphate production was determined as described previously (20).

Confocal fluorescence microscopy

Cells were plated onto poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) coated 4-wells Lab-Tek chambered coverglass (#155383, Nunc). After overnight incubation, cells were

transfected with 0.5µg/well of plasmid containing cDNA encoding GFP tagged CCK2R, β-arrestin2-GFP, Rab7-DsRed or Rab11-DsRed using a PEI (Roche). For lysosome staining, cells were incubated for 30 min in the presence of 75nM LysoTracker® (Invitrogen) for 30 min prior stimulation. 48 hours after transfection, the medium was replaced by PBS containing 0.2% BSA before stimulation. Cells were stimulated with MG10-IONP-DY647 (8µg Fe/mL) or CCK-DY647 (50 nM), and images of GFP, DsRed or DY647 fluorescence were collected on a Zeiss Laser Scanning Microscope (LSM-510).

Transmission Electron Microscopy of MG10-IONP-DY647

For transmission electron microscopy analysis of MG10-IONP-DY647 uptake and trafficking in Flp-InTM CCK2R-293 or HEK293 cells, cells were grown onto poly-L-lysine coated 6-well plates for 24h and incubated with MG10-IONP-DY647 (8µg Fe/mL) for indicated times in PBS 0.2% BSA. After removing medium, cells were fixed with 4% glutaraldehyde in Sorensen buffer for 4h at 4°C. Fixed cells were washed with cold Sorensen buffer for 12h and postfixed in 1% osmium tetra oxide (osmium 2%, saccharose 0.25 M, Sorensen 0.05 M) for 1h at 20°C, followed by washings with distilled water and uranyl acetate 2% for 12h at 4°C. The cells were dehydrated by sequential washings of 10 min in 30, 50, 70 and 95% ethanol followed by 3 washings of 15 min in absolute ethanol. Cells were then embedded in EMBED 812 resin for 12h. Resin polymerization was obtained at 60°C for 48h. Ultrathin sections of 70nm were prepared, stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a TEM (Hitachi HU12A, Japan) at 75 kVolts. To measure the size distribution of iron nanoparticles, an aliquot MG10-IONP-DY647 (50 µg/ml) was deposited on carbon-coated grid, let to dry then analyzed by TEM.

Kinetic of association and uptake of nanoconjugated MG10-IONP-DY647 by flow cytometry

Cells were trypsinased and transferred to polystyrene tubes. The cells were rinsed with PBS containing 0.5% BSA and then incubated for indicated times in 0.1 ml of PBS containing 0.5% BSA with MG10-IONP-DY647 (20µg/mL) or CCK-DY647 (125 nM) at 37°C. The cells were washed twice with cold PBS containing 0.5% BSA. Cell-associated fluorescence was determined using a BD FACSCaliburTM flow cytometer.

Dynamic light scattering measurements of hydrodynamic diameter

Suspension of iron nanoparticles at 0.1 mg/ml was prepared in 150 mM NaCl solution, 0.2% BSA in PBS or pure fetal bovine serum. The iron nanoparticle suspension was sonicated in an ultrason cuve (Bioblock Scientific 88154) for 10 min on ice. After temperature equilibrium to 20°C, particle size was measured by dynamic light scattering using Nanotracc 250 (Microtrac, York, PA).

Analysis of macrophage uptake of MG10-IONP-DY647 and inflammasome activation

To evaluate IL-1 β secretion, Raws 264.7 macrophages were primed with ultrapure lipopolysaccharide (LPS, 500 ng/ml) (Invivogen, Toulouse, France), for 4 hours. Medium was removed and cells were washed twice with PBS in order to remove LPS. Then, Raws 264.7 were stimulated with IONP-MG10-DY647 for 6 hours at 37°C. Supernatants were removed and assayed for IL-1 β secretion with ELISA kit according to the manufacturer instructions.

***In vivo* tumor models**

Tumoral glucagon secreting cells InR1G9 expressing the human CCK2R (19) and control cells not expressing the CCK2R were used. Heterotopic tumors were developed by sub-cutaneous inoculating cell suspension ($5 \cdot 10^6$ cells) into the two flanks of female swiss nude mice, 4-6 weeks old (Charles River, Saint Germain sur l'Arbresle, France). Animals were kept in animal facility for the development of tumors over a 3-5-week period in conditions in agreement with ethical committee recommendations. Nanoparticle suspension (50 μ g) was injected in the jugular vein. Twenty-four hours post-injection, mice were sacrificed and tissues were rapidly collected, fixed for 24–48 h in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin for histological analysis. Sections from paraffin blocks were stained with hematoxylin–eosin, mounted in glycergel and used for tissue histology analysis.

Determination of Iron content in cells and tissues

Quantity of iron accumulated in cells or tissues was determined according to a method previously described (21). Briefly, after nanoparticle uptake, cell or tissue samples were resuspended in 5N HCl ($2 \cdot 10^6$ cells in 70 μ l HCl or 300 mg of fresh tissue in 500 μ l HCl) and sonicated for 10 min. Acidic digestion was carried out

overnight at 37°C. Equal volumes of the prepared acidic samples and 4% potassium ferrocyanide containing 0.0015% H₂O₂ (v/v) were incubated at 37°C for 30 minutes. The absorption of the solution was then determined at a wavelength of 690 nm. The references for the calibration of the assays were prepared from Fe²⁺ solution at amounts between 0.1 and 4 µg Fe.

Iron detection on histological sections

3 µm-thick sections cut from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues were mounted on glass slides, deparaffinized in xylene and dehydrated in ethanol. The tissue section was exposed for 15 to 30 minutes at room temperature to a 1:1 solution of 0.5 N HCl and 2% K₄[Fe(CN)₆], washed in distilled water and counterstained with nuclear fast red, dehydrated in graded alcohol and mounted. The staining was analyzed on a Nikon E400 light microscope.

Results

Preparation of gastrin-decorated magnetic nanoparticles (MG10-IONP-DY647)

In order to target CCK2R with minor cross-recognition of the CCK1R which is also frequently expressed in tumors (13), gastrin was chosen as a cross-linked peptide to IONPs. Furthermore, on the basis of previous works showing that radiolabeled gastrin injected to animals was abundantly retained by the kidney due to the presence of 5 glutamic acids in the middle of the peptidic sequence, we designed a synthetic replicate of gastrin with presumably low renal retention and high affinity binding to the CCK2R (22, 23). This peptide, termed MG10, contains the same C-terminal bioactive sequence as CCK used as reference peptide for CCK2R studies but has all glutamic acid residues replaced by glycine (Fig. 1a). MG10 bound to CCK2R with only 7.3-fold lower affinity than CCK and stimulated production of inositol phosphates with the same efficacy as CCK and only 1.3-fold lower potency (Fig. 2a, b). Finally, this peptide triggered CCK2R internalization as demonstrated by endocytosis of GFP-tagged CCK2R over the time and trapping of DY647-MG10 within endocytotic vesicles (Fig. 2c).

Using the strategy schematized in Fig. 1b, MG10 was coupled to IONPs having characteristics depicted in table 1, yielding decorated magnetic nanoparticles

with both gastrin and DY647. An average number of 2.4 biologically active molecules of MG10/IONP was calculated. These were named MG10-IONP-DY647. Physico-chemical properties of the nanoparticles are shown on Fig. 3. The size of MG10-IONP-DY647 determined by transmission electronic microscopy was 8.7 ± 1.6 nm (Fig. 3a), a value in agreement with that given by the manufacturer (table 1). On the other hand, hydrodynamic sizes measured by dynamic light scattering in sodium chloride, in the presence of 0.2% BSA or in calf serum showed a majority of nanoparticles with sizes of 111 nm, 133 nm and 187 nm, respectively (Fig. 3b). After 90 min of incubation at 37°C, hydrodynamic sizes were 111, 133 and 158 nm, respectively. Dispersion of the size was more pronounced in the presence of serum compared to the two other media. Therefore, in the 3 solutions, MG10-IONP-DY647 nanoparticles behaved as aggregates of several individual nanoparticles and likely bind serum proteins *in vitro*.

Targeting of HEK 293 cells expressing CCK2R by MG10-IONP-DY647 and intracellular trafficking of nanoparticles

It is well recognized that minor modification of ligands can cause profound changes in their pharmacological properties including affinity, specificity as well as activity. It was therefore important to determine whether nanoconjugated MG10-IONP-DY647 behaved similarly or not to the native agonist of the CCK2R.

We previously precisely characterized the mechanism of CCK2R endocytosis in HEK293 cells expressing the CCK2R (Flp-InTMCCK2R-293) (18). This cell line was therefore used to study MG10-IONP-DY647 binding and intracellular trafficking. Flow cytometry analysis of fluorescence associated with the cells enabled to indistinctly quantify cell surface binding and internalization of ligands. As shown on Fig. 4, the time-course of MG10-IONP-DY647 association to Flp-InTMCCK2R-293 cells was slower than that of the reference fluorescent peptide CCK-DY647. CCK-DY647 fluorescence associated with the cells reached a plateau after ≈ 1 hour of incubation whereas MG10-IONP-DY647 fluorescence associated with the cells still augmented after 3 hours of incubation. Non specific MG10-IONP-DY647 binding to HEK293 cells not expressing CCK2R was significant since it represented an average of 27.4 ± 2.6 % of total binding after 3h whereas non specific CCK-DY647 binding remained not detectable (Fig. 4). Thus MG10-IONP-DY647 slightly interacted with HEK293 cells independently of binding to CCK2R.

Confocal microscopy observations confirmed slow binding of MG10-IONP-DY647 to the membrane of Flp-InTMCCK2R-293 cells which were progressively illuminated at their surface in the contact of MG10-IONP-DY647 (Fig. 5a). Furthermore, MG10-IONP-DY647 abundantly internalized over the time (Fig. 5a). Some non specific binding/uptake of red fluorescence was seen on HEK293 cells not expressing the CCK2R, or in the presence of 1 μ M on Flp-InTMCCK2R-293 (Fig. 5a).

Subcellular localization of MG10-IONP-DY647 was assessed using transmission electron microscopy. As illustrated on Fig. 5b, MG10-IONP-DY647 were located in endocytic vesicles. The number of nanoparticles in small vesicles as well as the number of vesicles containing nanoparticles increased within the first 2-3 h of incubation. Then, the size of vesicles containing MG10-IONP-DY647 clearly augmented showing intracellular accumulation and storage of highly concentrated particles (Fig. 5b).

Incubation of MG10-IONP-DY647 with HEK293 cells expressing GFP-tagged CCK2R showed co-localization of internalized MG10-IONP-DY647 with the CCK2R in endocytotic vesicles, as observed with CCK-DY647 (Fig. 6a,b). However, the time-course of co-localization slightly differed. Indeed, a persistent co-localization between CCK-DY647 and the CCK2R was observed over the time whereas progressive and partial dissociation between MG10-IONP-DY647 and GFP-tagged CCK2R was noted (Fig. 6). These results suggest that nanoconjugation of MG10 to magnetic nanoparticles affects the trafficking properties of internalized CCK2R and perhaps enables the CCK2R to recycle faster than when stimulated with non conjugated MG10.

To examine the possibility that MG10-IONP-DY647 may enhance CCK2R recycling, we evaluated the co-localization of CCK2R stimulated with MG10-IONP-DY647 versus CCK-DY647 in vesicles containing Rab-11, a small GTPase of recycling vesicles (24). As represented on Fig. 7, localization of CCK2R-GFP in Rab11-DsRed illuminated vesicles was maximal after 4 h of incubation with MG10-IONP-DY647 and then slightly decreased. When stimulated with CCK-DY647 (or with DY645-MG10, not shown), localization profile of CCK2R in Rab11-DsRed positive vesicles was significantly different, with a slower increase to a maximum after 5 h of incubation. However, no significant difference in receptor recycling at the cell surface could be detected in Flp-InTMCCK2R-293 stimulated by MG10-IONP-DY647 or CCK-

DY647 probably because of the low amount of recycled CCK2R previously evaluated to 10-15% levels (18).

We further determined whether nanoconjugation of MG10 to magnetic nanoparticles affects cellular and molecular mechanisms of endocytosis. We previously showed that the molecular mechanism of agonist-induced internalization of CCK2R involves recruitment of non visual arrestins, clathrin-coated pits, and dynamin (18). On Fig. 8a, confocal microscopy imaging of cells transiently expressing GFP tagged β -arrestin2 incubated with MG10-IONP-DY647 shows fluorescent nanoparticles in intracellular vesicles containing β -arrestin2. Furthermore, internalization of MG10-IONP-DY647 was blocked in the presence of the clathrin inhibitor (Fig 8c), chlorpromazine at 75 μ M (dose-response effect shown on Fig. S1). In line with this result, incubation of MG10-IONP-DY647 with cells transiently expressing eYFP tagged clathrin polypeptide showed abundant intracellular co-localization (Fig. 8e). Furthermore, MG10-IONP-DY647 internalization was inhibited in the presence of the dynamin inhibitor, dynasore (Fig. 8d). The possibility of MG10-IONP-DY647 uptake by Flp-InTMCCK2R-293 cells involving caveoles was also examined by testing effects of filipin, an inhibitor of caveoles. Abundant internalization of MG10-IONP-DY647 in the presence of filipin was still observed suggesting that MG10-IONP-DY647 endocytosis did not significantly occur through caveoles in HEK cells (Fig. 8f).

The intracellular fate of MG10-IONP-DY647 was analyzed using the lysosome staining reagent LysoTracker[®] and by incubating MG10-IONP-DY647 with cells transiently expressing DsRed tagged Rab-7, a small GTPase of late endosomes and lysosomes. As illustrated on Fig. 8g, a high proportion of LysoTracker[®] stained lysosomes contained MG10-IONP-DY647 after time longer than 1h of incubation with the cells, and co-localisation images between MG10-IONP-DY647 and Rab-7 were observed (Fig. 8h).

Together, this set of results demonstrates that nanoconjugation of MG10 to IONPs slows binding time-course of MG10 to cell surface CCK2R and by facilitating separation of the receptor from endocytotic vesicles, slightly accelerates its presence in recycling vesicles. However, likely due to slow and low recycling of the CCK2R, the impact of MG10-IONP-DY647 on the ability of the internalized CCK2R to recycle to the cell surface could not be evaluated but likely remains low. Importantly, MG10-IONP-DY647 uptake by cells is dependent on CCK2R internalization and involves

recruitment of β -arrestin2, clathrin-coated pits and dynamin. Furthermore, internalized MG10-IONP-DY647 are directed to lysosomes where they are trapped for times up to 24 h.

Targeting of InR1G9-CCK2R tumoral cells *in vitro* and *in vivo* by MG10-IONP-DY647 nanoparticles

Data obtained on Flp-InTMCCK2R-293 cells were verified on glucagon-producing hamster cells InR1G9 stably expressing the CCK2R (InR1G9-CCK2R). Confocal microscopy observations of cells incubated with MG10-IONP-DY647 confirmed specific binding of MG10-IONP-DY647 to the cells and subsequent internalization and transport to lysosomes (Fig. 9a, b). With InR1G9 lacking the CCK2R or InR1G9-CCK2R incubated in the presence of 1 μ M CCK, no significant binding and uptake MG10-IONP-DY647 could be noticed (Fig. 9c, d). Total amount of MG10-IONP-DY647 associated with InR1G9-CCK2R was about 2-fold lower than the amount associated with Flp-InTMCCK2R-293 (Fig. 9e), a result in agreement with the ratio between the number of CCK2R expressed in the two cell types (18, 19).

As a second approach, the ability of MG10-IONP-DY647 to target tumoral cells over-expressing CCK2R was evaluated *in vivo*. For this purpose, InR1G9-CCK2R or InR1G9 cells (not expressing CCK2R, binding control not shown) were transplanted to nude mice. Both cell lines yielded tumors of 0.8-1.2 cm size after 3-4 weeks of *in vivo* growth. MG10-IONP-DY647 were injected to animals bearing tumors which were sacrificed 24h post-injection for characterization of iron uptake by tumoral and non-tumoral tissues (Fig. 10). Some iron oxide nanoparticles were detected in the tumors as illustrated by presence of dispersed bleu spots and overall value of tissue content (4 ng Fe/ μ g proteins) (Fig. 10a,c). However, iron labeling and value of tissue content were similar in tumors grown from InR1G9-CCK2R or InR1G9 cells indicating that uptake of MG10-IONP-DY647 was independent of CCK2R expression in the tumor. Higher amounts of nanoparticles were found in the spleen and in the liver (Fig 10a, b). These data support that the uptake of nanoparticles by tumoral cells did not result from CCK2R targeting but rather resulted from EPR. On the other hand, accumulation of MG10-IONP-DY647 in spleen and liver, including in Kupffer cells suggests that nanoparticles were captured by macrophages.

Effect of MG10-IONP-DY647 nanoparticles on macrophages

It has been recognized that one of the primary targets of nanoparticles *in vivo* are resident macrophages of liver and spleen as well as monocytes and circulating macrophages involved in inflammation processes (4, 25, 26). Therefore, we tested the effect of MG10-IONP-DY647 on macrophages. As shown on Fig. 11a, b, incubation of MG10-IONP-DY647 with RAW 264.7 Mouse leukaemic monocyte macrophages or with peritoneal mouse macrophages *in vitro* resulted in rapid and abundant uptake of nanoparticles. Nevertheless, in contrast to nanosilice nanoparticles recognized as potent inducer of inflammasome {Yazdi, #232}, MG10-IONP-DY647 at concentrations up to 2mg/mL did not trigger IL1 β release in RAW 264.7 Mouse leukaemic monocyte macrophages (Fig. 11c).

Discussion

In the context of accumulation of data showing overexpression of peptide receptors in several types of tumors and their contributing role in cancer development (11, 27), the aim of this study was to nanoconjugate a synthetic analogue of gastrin in order to produce a magnetic nanoplatform for targeted diagnosis and therapy of tumors overexpressing the CCK2R.

A synthetic analogue of gastrin (MG10) was coupled to iron oxide nanoparticles. This peptide pharmacologically behaves similarly to CCK, the most efficient and potent natural agonist of the CCK2R. Structurally, MG10 lacks the five glutamic acids present in the native structure of gastrin since they were shown to cause renal retention of the peptide in rodents.

Iron oxide nanoparticles decorated with MG10 for CCK2R targeting, and with DY647 for microscopy imaging, were then characterized. Hydrodynamic size measurement by dynamic light scattering in sodium chloride solution or in pure serum indicate a tendency of the nanoparticles to aggregate or to bind serum macromolecules.

Characterization of MG10-IONP-DY647 nanoparticles for their ability to bind and enter cells expressing the CCK2R and the underlying mechanism of internalization was carried out on HEK293 cells, a reference cell model for characterization of membrane receptor internalization, as previously achieved with

the human CCK2R (18). MG10-IONP-DY647 nanoparticles appear to bind and internalize slower than fluorescent CCK. After binding to CCK2R, MG10-IONP-DY647 nanoparticles internalize together with the CCK2R most likely through the same initial molecular mechanism as in CCK-stimulated internalization. Indeed, key steps such as β -arrestin-2 recruitment, involvement of clathrin-coated pits and dynamin were both observed (18). However, results from investigations of CCK2R intracellular trafficking using tracing with DsRed tagged Rab-11, a small GTPase of slow recycling vesicles strongly support that nanoconjugation of MG10 modulates CCK2R trafficking. This result must be discussed in light to data showing that internalization and trafficking of a given G-protein coupled receptor, is initially dictated by its ligand. Internalization of CCK2R following full agonists stimulation (CCK or gastrin) first involves phosphorylation of a Ser/Thr motif located on C-terminal region of the receptor, subsequent rapid and high affinity binding of β -arrestins which, through binding to adaptin complex (AP-2) targets the cargo to clathrin coated-pits. Both the ligand, the receptor and β -arrestins are found as macromolecular complexes in endocytotic vesicles (18). We also showed that agonists of the CCK2R stimulating G-protein dependent signaling pathway, namely activation of phospholipase-C to a maximum representing 30% of that achieved with the full agonist do not trigger recruitment of β -arrestins and CCK2R internalization (18). These ligands are biased ligands since they have unbalanced effects on different molecular events down-stream their common receptor (28). It has been documented that biased agonists are unable to stabilize the same receptor conformation as does a balanced agonist (29, 30). In the case of CCK2R stimulated by MG10-IONP-DY647, it is plausible that the coupling of MG10 to nanoparticles affects conformation of the CCK2R they stabilize relative to that stabilized by unconjugated CCK or MG10. Thus, although CCK2R stimulated by MG10-IONP-DY647 retains its ability to internalize with β -arrestin-2, it is not excluded that stability of the endocytotic complex is modified due to nanoconjugation of MG10. As a consequence, trafficking of CCK2R would be slightly modified. Our data are in agreement with a report showing that nanoconjugation of an antibody directed against EGF receptor modulates antibody-induced internalization of this receptor (31). Furthermore, it has been also shown that ligand dissociation from G-protein coupled receptors and subsequent degradation by endosomal peptidases controls trafficking and endosomal signaling of peptide receptors. For example, endothelin-converting

enzyme 1 (ECE-1) rapidly degrades substance P, calcitonin gene-related peptide (CGRP) and somatostatin in endosomes disrupt the peptide-receptor- β -arrestin complex, allowing β -arrestins to return to the cytoplasm and receptors, free from β -arrestins, to recycle (32-34). For class B GPCRs such as the CCK2R, dissociation from β -arrestin in endosomes is necessary for recycling and resensitization (35). As an alternative hypothesis to explain the increase of time-course of CCK2R localization in Rab-11 positive recycling vesicles, CCK2R internalization as oligomers due to simultaneous binding of MG10-IONP-DY647 to several receptor molecules at a time can be also considered. Such multi-ligand binding was described for neuropeptide Y1 receptor when targeted by neuropeptide Y-decorated quantum dots (36). On the other hand, CCK2R-independent uptake of MG10-IONP-DY647 (termed non specific in our study) representing 30% of total uptake and the mechanism of which is still unknown as well as the size of nanoparticle aggregates internalized, may modify overall vesicular trafficking in HEK293 cells. Importantly, besides modifications of CCK2R trafficking, internalized MG10-IONP-DY647 nanoparticles are directed to lysosomes where they accumulate both in HEK293 and InR1G9 tumoral cells.

Accumulation of magnetic nanoparticles in lysosomes offers both diagnostic and therapeutic opportunities which, however, remain to be demonstrated with MG10-IONP-DY647. First, on the example of inflammation diseases, MRI imaging of tumors can be enhanced by iron magnetic nanoparticles which play a role of contrast agent. Second, IONPs can be used for hyperthermia therapy of tumors. Finally, due to their endosomal trafficking and lysosomal fate, IONP can serve as drug delivery systems to tumoral cells. A major pre-requisite to these applications resides in the efficiency of tumor targeting *in vivo*.

Our first attempts to target tumoral cells *in vivo* in nude mice were carried out by comparing uptake of MG10-IONP-DY647 by transplanted tumoral cells expressing or not expressing CCK2R. Unfortunately, so far, no significant enhanced accumulation of iron oxide could be found in tumors grown from cells expressing the CCK2R, although iron staining supports that there was some uptake of nanoparticles by tumoral cells. Thus, uptake of MG10-IONP-DY647 seems to result mainly from the EPR mechanism (enhanced permeability and retention effect) whereby nanoparticles accumulate at concentrations higher in tumors relative to healthy adjacent tissues because of tumoral vascularisation and endothelium extravasation independently of

specific targeting. Quantities of iron in liver and spleen were about 4- and 6-fold higher than those in tumors reflecting phagocytosis of nanoparticles by both circulating macrophages and resident macrophages of the reticuloendothelial system. Abundant uptake of nanoparticles by macrophages was confirmed with RAW264.7 macrophage cell line and macrophages isolated from mice. Nevertheless, in contrast to Si-nanoparticles and double-walled carbon nanotubes {Yazdi, #232}{Meunier, #233}, MG10-IONP-DY647 nanoparticles, even at high concentrations, do not promote inflammation as shown by the absence of IL1 β secretion.

In order to explain the absence of significant targeting of tumoral cells expressing the CCK2R *in vivo*, two main reasons can be proposed. First, a drop of CCK2R expression in transplanted cells *in vivo* can be considered. Although this hypothesis is very unlikely because in LnR1G9 cells expression of CCK2R cDNA is constitutive under the control of CMV promoter, further experiments will have to address this issue. As a second hypothesis which is more consistent and in agreement with both our results and the data from the literature, is that the absence of significant targeting may be due to abundant uptake of MG10-IONP-DY647 nanoparticles by macrophages before the nanoparticles reach their right target cells. First, nanoparticles are abundant in the spleen and in the liver, including in kupffer cells which are resident macrophages of the liver. Second, MG10-IONP-DY647 are rapidly and abundantly internalized by macrophages *in vitro*. Third, dynamic light scattering analysis of MG10-IONP-DY647 reveals some aggregation and/or adsorption of serum proteins which may dictate macrophage recognition *in vivo*.

The different parameters which influence macrophage recognition have been carefully investigated during the recent period. Indeed, besides the optimal size of nanoparticles and their chemical coating which, in the current study theoretically fulfill criteria for a good stealth, fouling of serum proteins has been recognized as crucial contributor in macrophage phagocytosis (37). The surface characteristics (hydrophobicity, charge), curvature and size of nanoparticles can affect both the amount and nature of serum proteins which bind to nanoparticles. Moreover, adsorption of specific blood proteins termed opsonins (complement proteins, IgG, laminin) facilitates recognition and quick uptake by macrophages (38, 39). Recently, blood protein interactions with iron oxide nanoparticles and the impact on macrophage uptake have elegantly been reported (40). In contrast to negatively charged or citrate coating, a hydrophilic glucose-derivative coating was found to

inhibit protein adsorption on the surface of nanoparticles and preserve both high stability in serum and low uptake by macrophages. Furthermore, fouling of protein was shown to be highly dependent on protein concentration and contribute to stabilize individual nanoparticles. It was also demonstrated that the cells perceives dissimilar populations of nanoparticles which differ in their level of clustering, as well as in their protein fingerprint. The authors suggested that for a given population of nanoparticles intravenously injected, a variety of nanoparticles-protein complexes will be formed with distinct biological fates (40). Such information opens new perspective for improvement of MG10-IONP-DY647 nanoparticles in order to target tumors expressing CCK2R *in vivo*.

In conclusion, iron oxide nanoparticles decorated with a synthetic replicate of gastrin have been developed. They recognize cells expressing the CCK2R with a satisfactory specificity *in vitro* and, once bound to CCK2R internalized via a mechanism involving recruitment of β -arrestins, clathrin-coated pits and dynamin, they are directed to lysosomes. However, when injected to animals bearing tumors grown from tumoral endocrine cells expressing the CCK2R, they did not accumulate in the tumor due to expression of the CCK2R but rather reach the tumor via EPR mechanism. The high amount of nanoparticles found in the spleen and in the liver as well as quick and abundant uptake of nanoparticles by macrophages supported capture of nanoparticles by resident and circulating macrophages *in vivo*. Investigations aimed at optimization of the density of gastrin molecules at the surface of the nanoparticles and apparent physico-chemical properties are in progress.

Legends to Figures

Table 1: Characteristics of iron nanoparticles provided by the manufacturer

Fig. 1: Schematic representation of nano-conjugation method to magnetic iron oxide

a: Synthetic replicate of gastrin (MG10) and cholecystokinin (CCK) used in the study. Amino-acids in red are common to CCK and gastrin and correspond to the biologically active region of the two regulatory peptides. N-terminal part of CCK, especially position and sulfatation of the tyrosine, which differs from that of gastrin

enables selective high affinity binding of CCK to the CCK1R. This region is not important for CCK2R recognition (7).

b: Scheme for the bioconjugation reaction yielding MG10-IONP-DY647. Details of the protocols are given in “Materials and methods” section. The layer colored in yellow represents coating by polyethylene glycol 2000.

Fig. 2: MG10 is a high affinity full agonist of the CCK2R which stimulates CCK2R internalization

a: Competitive binding of MG10 to CCK2R. Inhibition binding was carried out by incubating radio-iodinated CCK with HEK293 cells transiently expressing CCK2R in the presence of increasing concentrations of competitor as described in experimental procedure section. Calculated IC_{50} was 6.0 ± 1.4 nM for CCK and 44.0 ± 1.0 nM for MG10. Results are the mean \pm SEM of 3 experiments.

b: MG10-induced inositol phosphate production. Inositol phosphate production (Ins-P) was measured on HEK293 cells transiently expressing CCK2R cell following 60 min of stimulation with CCK or MG10. Concentrations giving half-maximal production (EC_{50}) for CCK was 1.4 ± 0.5 nM and for MG10 was 1.8 ± 0.3 . Results are the mean \pm SEM of 3 experiments.

c: MG10-induced CCK2R internalization. HEK293 cells transfected with CCK2R-GFP were incubated at 37°C with DY647-MG10 (50 nM). The images show initial binding of DY647-MG10 at the cell surface and internalization of CCK2R-GFP following stimulation with DY647-MG10. Merged images show co-localization of DY647-MG10 with CCK2R-GFP at initial time and at 30 min.

Fig. 3: Transmission electron microscopy and dynamic light scattering analysis of nanoconjugated MG10-IONP-DY647

a: Transmission electron microscopy analysis of MG10-IONP-DY647 showing size homogeneity of IONP nanoparticles. A calculated average size of 8.7 ± 1.6 nm was calculated.

b: Dynamic light scattering analysis of MG10-IONP-DY647 in NaCl solution, PBS 0.2% BSA or pure foetal calf serum immediately after sonication and 90 minutes later.

Fig. 4: Kinetic and specificity of association and uptake of nanoconjugated MG10-IONP-DY647 or CCK-DY647.

Flp-InTMCCK2R-293 or HEK293 cells were incubated with nanoparticles (20µg Fe/ml) or CCK-DY647 (125 nM) for indicated times at 37°C. DY647 fluorescence was analyzed by flow cytometry. Results are expressed as the percent of maximum fluorescence of MG10-IONP-DY647 or CCK-DY647 associated with the cells.

Fig. 5: Nanoconjugated MG10-IONP-DY647 specifically binds to Flp-InTMCCK2R-293 cells and are subsequently internalized and trapped within the cells.

a: Association of nanoconjugated MG10-IONP-DY647 to HEK293 cells expressing or not expressing CCK2R. Flp-InTMCCK2R-293 cells were incubated at 37°C with MG10-IONP-DY647 alone (8µg Fe/ml, confocal microscopy images are shown for times shown: 15, 30, 60, 120, 180 min; time 24h corresponds to an uptake during 180 min followed by an additional 21h incubation without nanoparticles) or in the presence of CCK 1µM (shown for incubation time 60 min). Non specific uptake by HEK293 cells not expressing CCK2R is also shown for time 60 min.

b: Electron microscopy analysis of MG10-IONP-DY647 internalization in Flp-InTMCCK2R-293 cells. Cells were incubated with nanoparticles (8µg Fe/ml) for 30 or 180 min at 37°C. Time 24h corresponds to an incubation of 180 min in the presence of nanoparticles followed by additional 21h-incubation without nanoparticles. Arrows depict presence of nanoparticles in endocytotic vesicles.

Fig. 6: Nanoconjugated MG10-IONP-DY647 internalization involves binding to membrane CCK2R but dissociate faster from internalized CCK2R than non-conjugated fluorescent ligand

a, b: Confocal microscopy images illustrating changes in co-localization between MG10-IONP-DY647 and CCK2R-GFP over the time. HEK293 cells transiently expressing CCK2R-GFP were incubated with (a) nanoparticles (8µg Fe/ml) or (b) CCK-DY647 (50 nM). At indicated times, confocal microscopy images were captured. Merge images are shown.

Fig. 7: Time-course of CCK2R localization in recycling vesicles following stimulation with nanoconjugated MG10-IONP-DY647 or CCK-DY647

HEK293 cells transiently co-expressing CCK2R-GFP and Rab11-dsRed were incubated with MG10-IONP-DY647 nanoparticles (8 µg Fe/ml) or CCK-DY647 (50 nM) for 2h at 37°C. After 2h, images were captured at indicated times. Cells expressing both fluorescent proteins were counted and the percent of cell presenting co-localization between the CCK2R-GFP and Rab11-dsRed was determined. Twenty cells were counted for each conditions, from 3 separate experiments.

Below the graph, examples of confocal microscopy images of co-localization between CCK2R-GFP and Rab-11-DsRed are shown.

Fig. 8: Characterization of the molecular mechanism of nanoconjugated MG10-IONP-DY647 endocytosis in Flp-InTMCCK2R-293 cells

a: Nanoconjugated MG10-IONP-DY647 internalize through recruitment of β -arrestin-2. Flp-InTMCCK2R-293 cells transiently expressing β -arrestin-2-GFP were incubated with MG10-IONP-DY467. At initial time, β -arrestin-2 (in green) was uniformly scattered in the cytoplasm whereas after 30 min of stimulation with nanoparticles, it was also seen in endocytotic vesicles together with MG10-IONP-DY647 (in red).

b, c, d : Nanoconjugated MG10-IONP-DY647 internalize via clathrin coated-pits and require dynamin. Flp-InTMCCK2R-293 cells were incubated at 37°C for 60 min with (b) MG10-IONP-DY467 alone or (c) in the presence of the clathrin coated-pits inhibitor chlorpromazine (75 µM) or (d) in the presence of the dynamin inhibitor, dynasor (160 µM). Dose-reponse effect of chlorpromazine is shown in **Fig. S1**.

e: Nanoconjugated MG10-IONP-DY647 internalize together with clathrin.

Flp-InTMCCK2R-293 cells transiently expressing clathrin-LCa-eYFP were incubated with MG10-IONP-DY647 at 37°C.

f: Nanoconjugated MG10-IONP-DY647 internalization is not sensitive to filipin, an inhibitor of caveoles. Flp-InTMCCK2R-293 cells were incubated at 37°C for 60 min with MG10-IONP-DY467 in the presence of the caveole inhibitor, filipine (10 µM).

g, h : Internalized nanoconjugated MG10-IONP-DY647 are directed to lysosomes. g: Flp-InTMCCK2R-293 cells were pre-incubated with LysoTracker[®] (75 µM) for 30 min before incubation with MG10-IONP-DY647. Fluorescence of LysoTracker[®] is shown in green and images correspond to incubation times 1h, 6h and 24h. Quantification of lysosomes containing MG10-IONP-DY647 or CCK-DY647 after different times of incubation showed similar time-courses of trafficking to

lysosomes (not shown). **h:** Flp-InTMCCK2R-293 cells transiently expressing Rab7-DsRed were incubated with MG10-IONP-DY647. Images correspond to incubation times 6h and 24h. Rab7-DsRed is shown in green.

Fig. 9: Endocytosis of MG10-IONP-DY647 in InR1G9-CCK2R

a: Time-course of internalization. InR1G9-CCK2R cells were incubated with MG10-IONP-DY647 (8µg Fe/ml) at 37°C. DY-647 fluorescence is shown at times 30, 60, 180 min and 24h.

b: Intracellular trafficking to lysosomes. InR1G9-CCK2R cells were incubated with MG10-IONP-DY647 for 24h at 37°C. Cells were pre-loaded with LysoTracker[®] (75 µM) for 30 min before observation. Fluorescence of LysoTracker[®] is shown in green.

c: Specificity of internalization. InR1G9-CCK2R cells were incubated with MG10-IONP-DY647 (8µg Fe/ml) at 37°C in the presence of CCK 1µM.

d: Absence of significant MG10-IONP-DY647 uptake in InR1G9 not expressing CCK2R. InR1G9 cells were incubated with MG10-IONP-DY647 (8µg Fe/ml) at 37°C.

e: Quantification of association and uptake of MG10-IONP-DY647 in Flp-InTMCCK2R-293 and InR1G9-CCK2R cells. Flp-InTMCCK2R-293 or InR1G9-CCK2R cells were incubated with MG10-IONP-DY647 (20µg Fe/ml) for 3h at 37°C. DY647 fluorescence was analyzed by flow cytometry.

Fig. 10: *In vivo* targeting of tumoral cells

a: Tissue Perl's Prussian staining from mice injected with MG10-IONP-DY647. Mice bearing InR1G9-CCK2R xenograft were iv injected with MG10-IONP-DY647 (50µg) and were sacrificed after 24h. Iron from histological sections of tumor and liver was revealed by Perl's Prussian staining reagent.

b: Transmission electron microscopy of Kupffer cell in liver histological section. Mice bearing InR1G9-CCK2R xenograft were iv injected with MG10-IONP-DY647 (50µg) and were sacrificed after 24h. TEM image show MG10-IONP-DY647 containing vesicles in kupffer cell from the liver (arrows).

c: Determination of Iron content in tissues. Mice bearing InR1G9-CCK2R xenograft were iv injected with MG10-IONP-DY647 (50µg) and were sacrificed after 24h. Tumor, liver and spleen were collected, disrupted, and iron content was assayed with Perl's Prussian staining reagent.

Fig. 11: Macrophage uptake of MG10-IONP-DY647 and inflammasome activation

a: Uptake of nanoparticles by RAW 264.7 Mouse leukaemic monocyte macrophages. Confocal microscopy images illustrating RAW 264.7 cells incubated with MG10-IONP-DY647 (8 µg Fe/mL) for indicated time at 37°C.

b: Uptake of nanoparticles by mouse macrophages. Confocal microscopy images illustrating mouse peritoneal macrophages incubated with MG10-IONP-DY647 (8 µg Fe/mL) for indicated time at 37°C.

c: Assay of IL-1β secretion. Untreated or LPS-primed Raws 264.7 cells were stimulated with increasing concentrations of MG10-IONP-DY647 or with nanoSilica (0.2 mg/mL) for 6h at 37°C. IL-1 β release in culture supernatant was assayed with ELISA kit.

References

1. Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer* 2005;5:161-71.
2. Murthy SK. Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges. *Int J Nanomedicine* 2007;2:129-41.
3. Bulte JW, Kraitchman DL. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed* 2004;17:484-99.
4. Corot C, Robert P, Idee JM, Port M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58:1471-504.
5. Johannsen M, Thiesen B, Wust P, Jordan A. Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer. *Int J Hyperthermia*;26:790-5.
6. Kobayashi T. Cancer hyperthermia using magnetic nanoparticles. *Biotechnol J*;6:1342-7.
7. Dufresne M, Seva C, Fourmy D. Cholecystokinin and gastrin receptors. *Physiol Rev* 2006;86:805-47.
8. Fourmy D, Gigoux V, Reubi JC. Gastrin in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology*;141:814-8 e1-3.
9. Reubi JC, Schaer JC, Waser B. Cholecystokinin(CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors. *Cancer Res* 1997;57:1377-86.
10. Reubi JC, Waser B. Unexpected high incidence of cholecystokinin-B/gastrin receptors in human medullary thyroid carcinomas. *Int J Cancer* 1996;67:644-7.
11. Reubi JC. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr Rev* 2003;24:389-427.
12. Rehfeld JF. Four basic characteristics of the gastrin-cholecystokinin system. *Am J Physiol* 1981;240:G255-66.
13. Reubi JC. Targeting CCK receptors in human cancers. *Curr Top Med Chem* 2007;7:1239-42.

14. Reubi JC, Maecke HR. Peptide-based probes for cancer imaging. *J Nucl Med* 2008;49:1735-8.
15. Moroder L, Wilschowitz L, Gemeiner M, et al. [Cholecystokinin-pancreozymin synthesis. Synthesis of [28-threonine,31-norleucine]- and [28-threonine,31-leucine]cholecystokinin-pancreozymin-(25-33)-nonapeptide]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1981;362:929-42.
16. Fourmy D, Lopez P, Poirot S, et al. A new probe for affinity labelling pancreatic cholecystokinin receptor with minor modification of its structure. *Eur J Biochem* 1989;185:397-403.
17. Yaqub T, Tikhonova IG, Lattig J, et al. Identification of determinants of glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor that interact with N-terminal biologically active region of the natural ligand. *Mol Pharmacol* 2010;77:547-58.
18. Magnan R, Masri B, Escriet C, Foucaud M, Cordelier P, Fourmy D. Regulation of membrane cholecystokinin-2 receptor by agonists enables classification of partial agonists as biased agonists. *J Biol Chem* 2011;286:6707-19.
19. Leung-Theung-Long S, Roulet E, Clerc P, et al. Essential interaction of Egr-1 at an islet-specific response element for basal and gastrin-dependent glucagon gene transactivation in pancreatic alpha-cells. *J Biol Chem* 2005;280:7976-84.
20. Foucaud M, Marco E, Escriet C, Low C, Kalindjian B, Fourmy D. Linking non-peptide ligand binding mode to activity at the human cholecystokinin-2 receptor. *J Biol Chem* 2008;283:35860-8.
21. Boutry S, Forge D, Burtea C, et al. How to quantify iron in an aqueous or biological matrix: a technical note. *Contrast Media Mol Imaging* 2009;4:299-304.
22. Behe M, Kluge G, Becker W, Gotthardt M, Behr TM. Use of polyglutamic acids to reduce uptake of radiometal-labeled minigastrin in the kidneys. *J Nucl Med* 2005;46:1012-5.
23. Laverman P, Joosten L, Eek A, et al. Comparative biodistribution of ¹²⁵I(1)(1)(1)In-labelled gastrin/CCK2 receptor-targeting peptides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011;38:1410-6.
24. Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:513-25.
25. Daldrup-Link HE, Golovko D, Ruffell B, et al. MRI of tumor-associated macrophages with clinically applicable iron oxide nanoparticles. *Clin Cancer Res*;17:5695-704.
26. Levy M, Luciani N, Alloyeau D, et al. Long term in vivo biotransformation of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*;32:3988-99.
27. Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7:79-94.
28. Violin JD, Lefkowitz RJ. Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2007;28:416-22.
29. Liu JJ, Horst R, Katritch V, Stevens RC, Wuthrich K. Biased Signaling Pathways in beta2-Adrenergic Receptor Characterized by 19F-NMR. *Science* 2012.
30. Kahsai AW, Xiao K, Rajagopal S, et al. Multiple ligand-specific conformations of the beta2-adrenergic receptor. *Nat Chem Biol* 2011;7:692-700.
31. Bhattacharyya S, Bhattacharya R, Curley S, McNiven MA, Mukherjee P. Nanoconjugation modulates the trafficking and mechanism of antibody induced receptor endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*;107:14541-6.
32. Padilla BE, Cottrell GS, Roosterman D, et al. Endothelin-converting enzyme-1 regulates endosomal sorting of calcitonin receptor-like receptor and beta-arrestins. *J Cell Biol* 2007;179:981-97.

33. Roosterman D, Cottrell GS, Padilla BE, et al. Endothelin-converting enzyme 1 degrades neuropeptides in endosomes to control receptor recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:11838-43.
34. Roosterman D, Kempkes C, Cottrell GS, et al. Endothelin-converting enzyme-1 degrades internalized somatostatin-14. *Endocrinology* 2008;149:2200-7.
35. Murphy JE, Padilla BE, Hasdemir B, Cottrell GS, Bunnett NW. Endosomes: a legitimate platform for the signaling train. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:17615-22.
36. Hild W, Pollinger K, Caporale A, et al. G protein-coupled receptors function as logic gates for nanoparticle binding and cell uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A*;107:10667-72.
37. Almeida JP, Chen AL, Foster A, Drezek R. In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)* 2011;6:815-35.
38. Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61:428-37.
39. Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat Nanotechnol* 2007;2:469-78.
40. Lartigue L, Wilhelm C, Servais J, et al. Nanomagnetic sensing of blood plasma protein interactions with iron oxide nanoparticles: impact on macrophage uptake. *ACS Nano*;6:2665-78.

NIMT FeOdot PEG-Amine	
Iron concentration	1.5 mg·mL ⁻¹
Iron oxide (Fe ₃ O ₄) concentration	2.0 mg·mL ⁻¹
Number of particles in 1 mL of solution	~ 5·10 ¹⁴
Molar concentration of particles	~ 0.75 μM
Number of Amino groups / particle	~ 700
Core diameter (TEM)	11 ± 1 nm
Particle diameter including coating (TEM)	18 ± 2 nm
Hydrodynamic particle diameter including coating (DLS)	30 nm
Magnetic Susceptibility	80 emu·g ⁻¹
r2 relaxivity	~ 300 mM ⁻¹ ·S ⁻¹

Table. 1

- a**
- | | |
|------|--|
| MG10 | Gly-Gly-Gly-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂ |
| CCK | Arg-Asp-Thr-Tyr(SO ₃ H)-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂ |

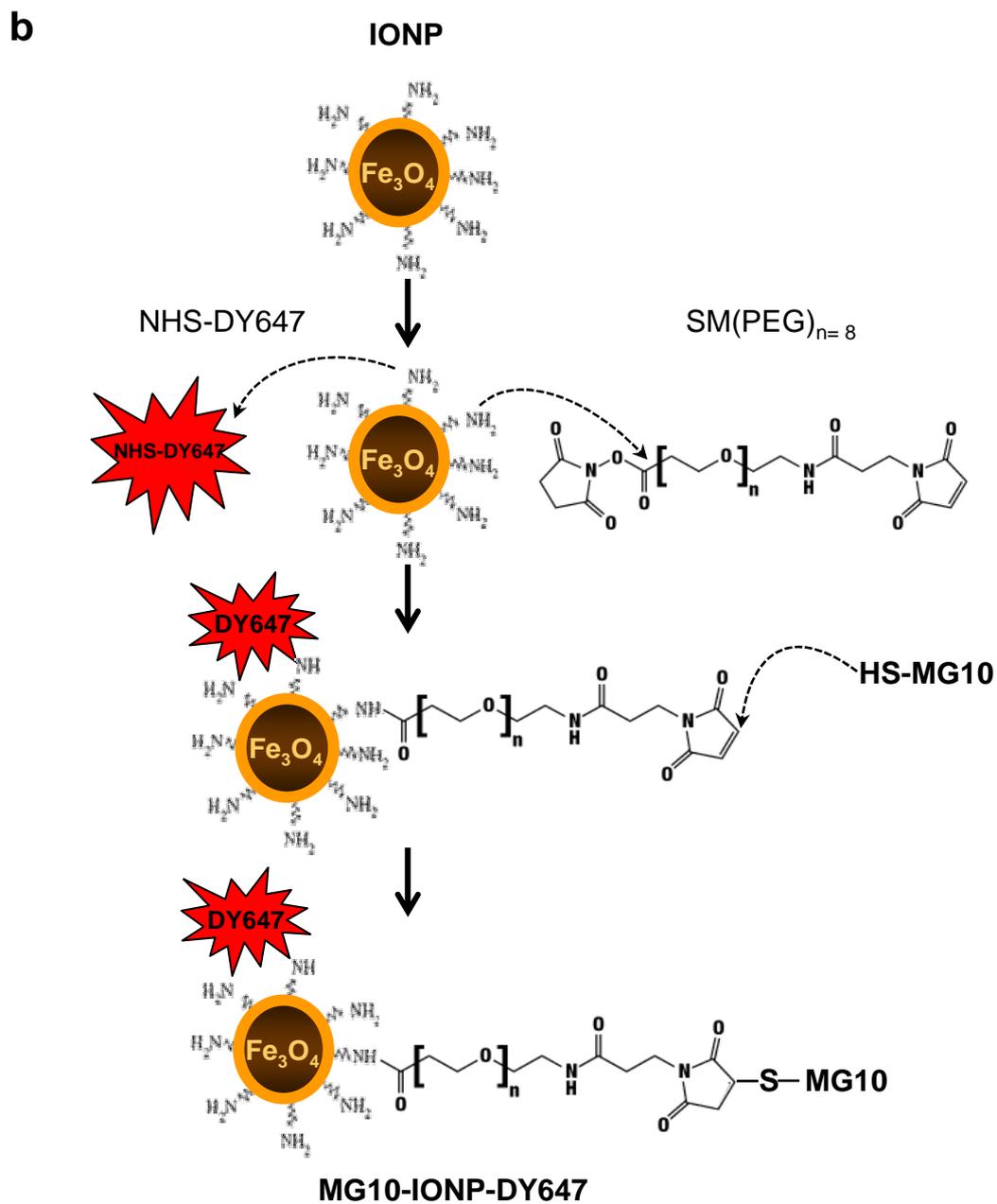


Fig. 1

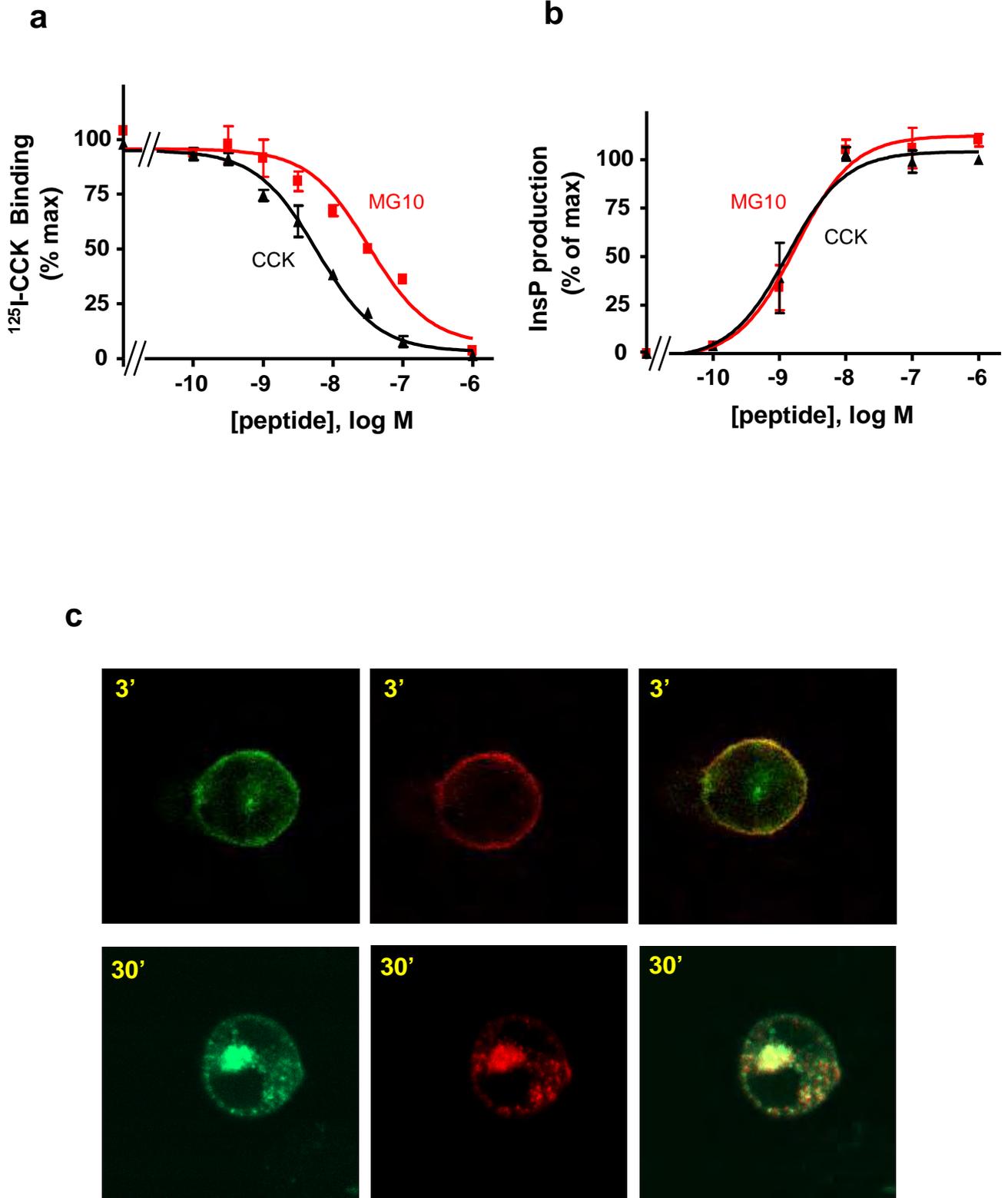
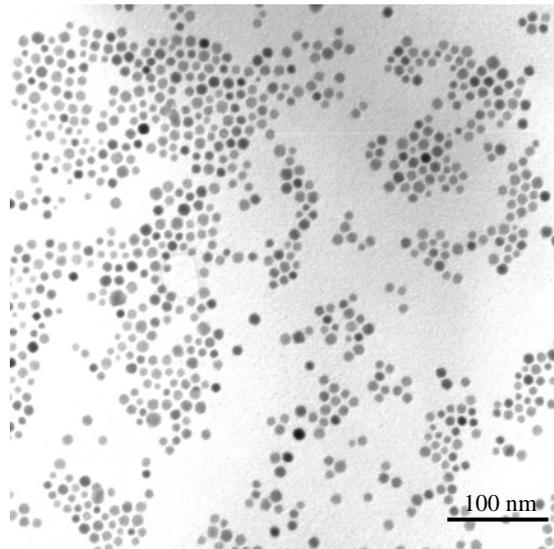


Fig. 2

a



b

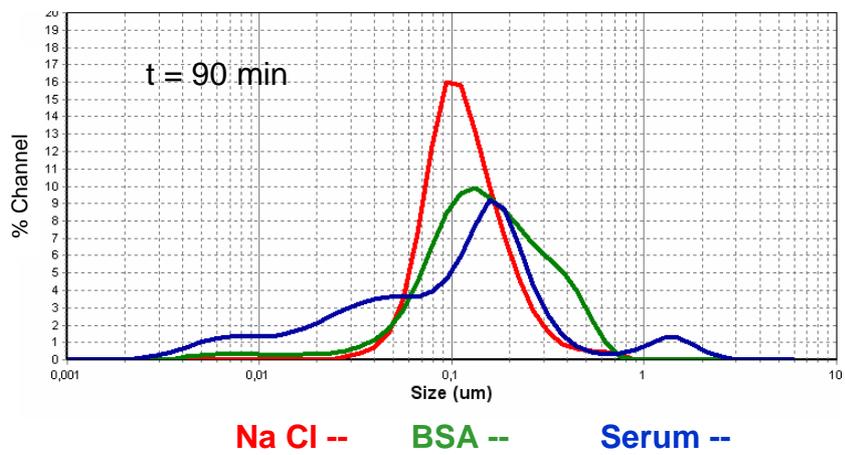
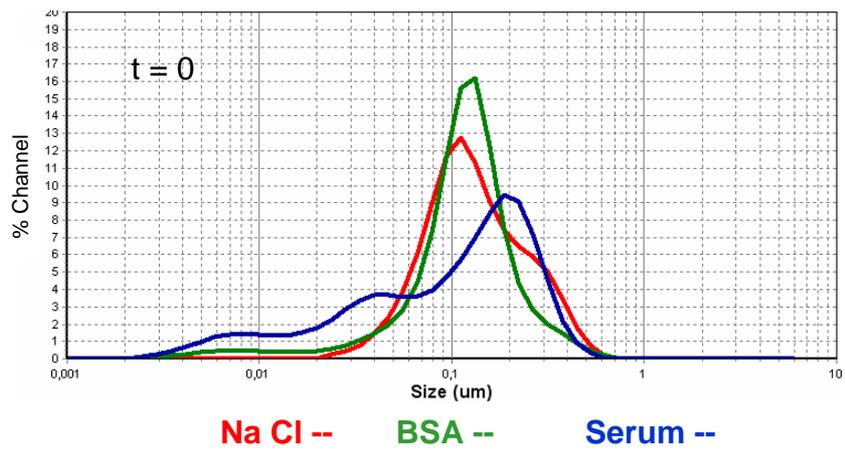


Fig. 3

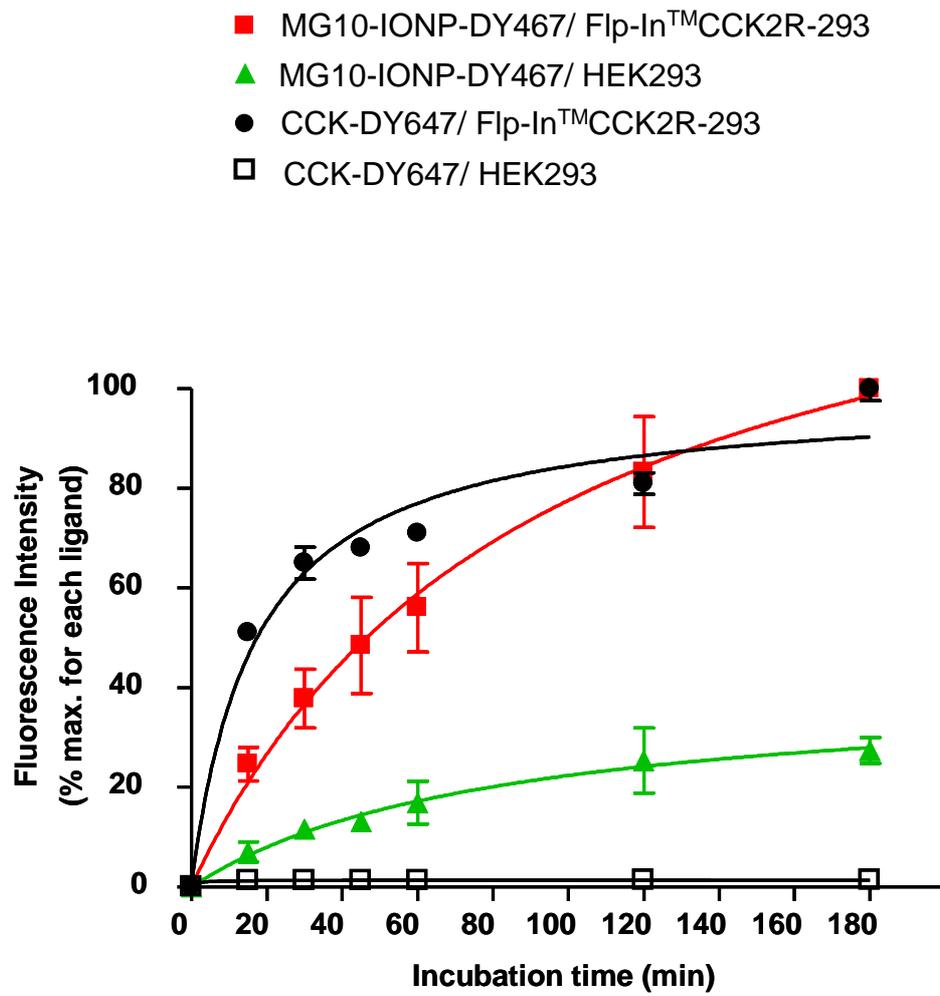
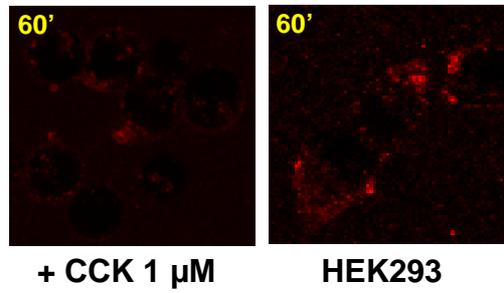
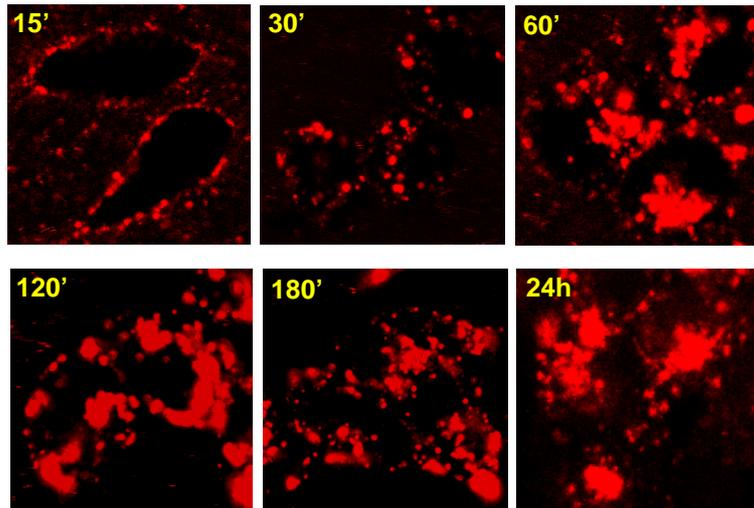


Fig. 4

a



b

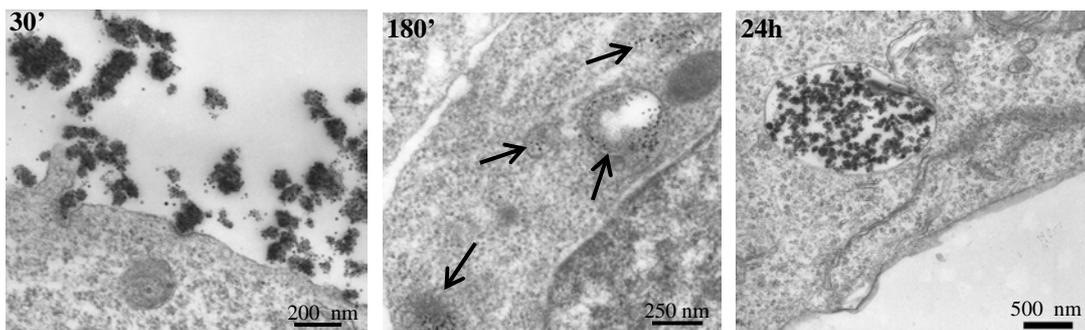
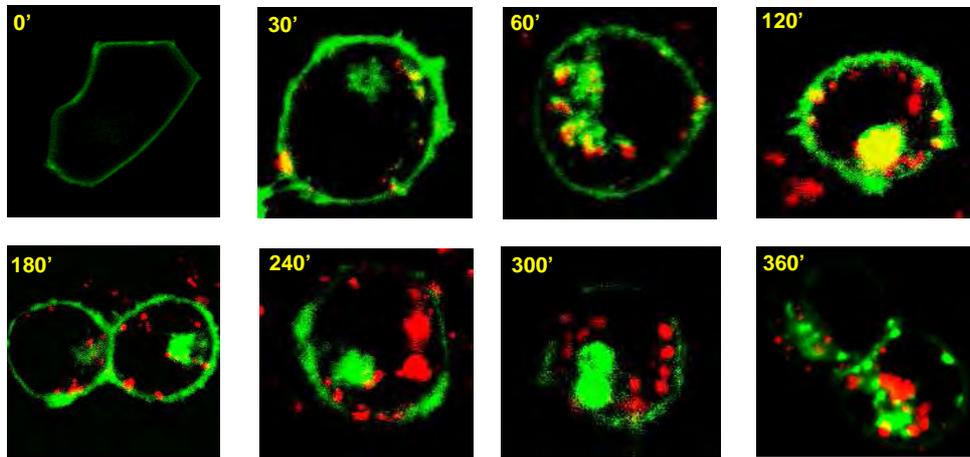


Fig. 5

a



b

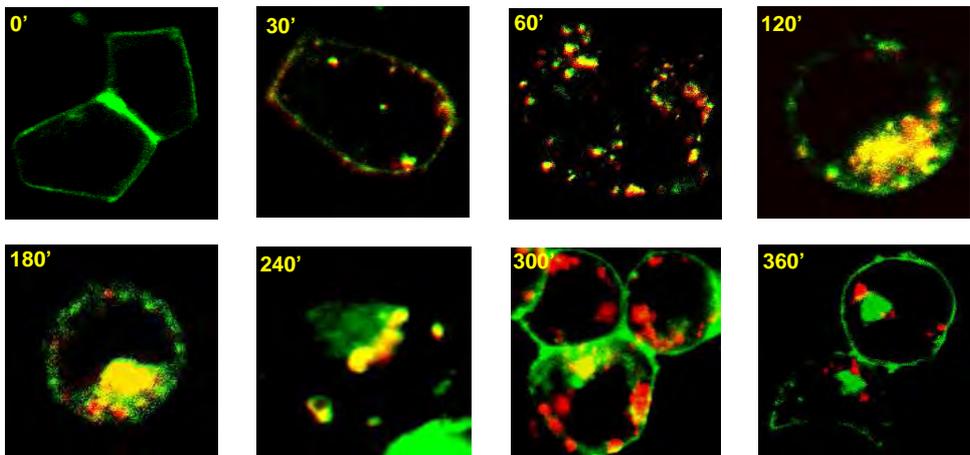


Fig. 6

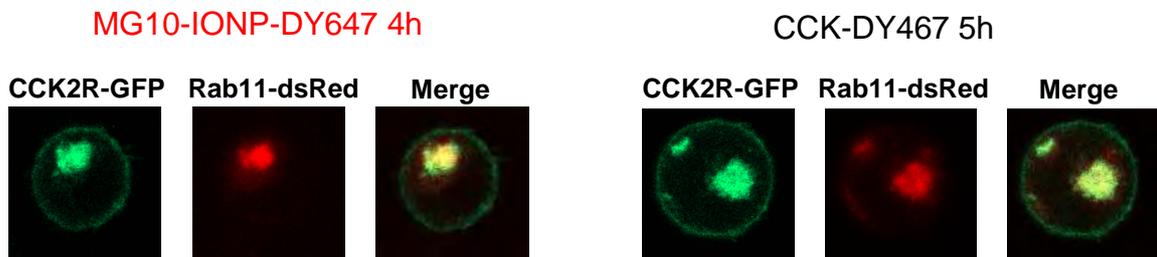
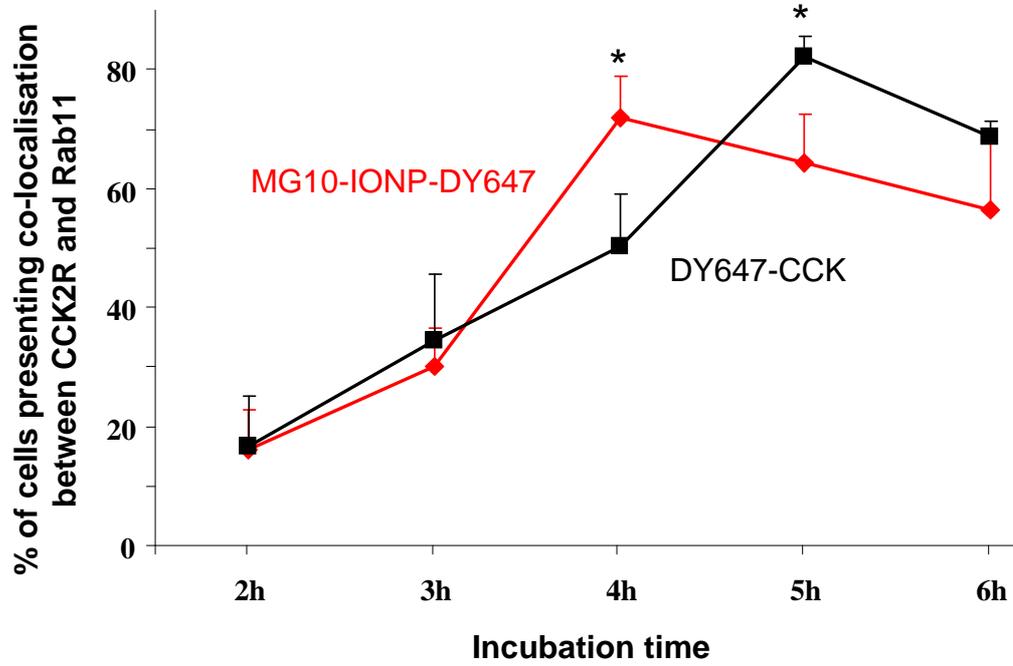


Fig. 7

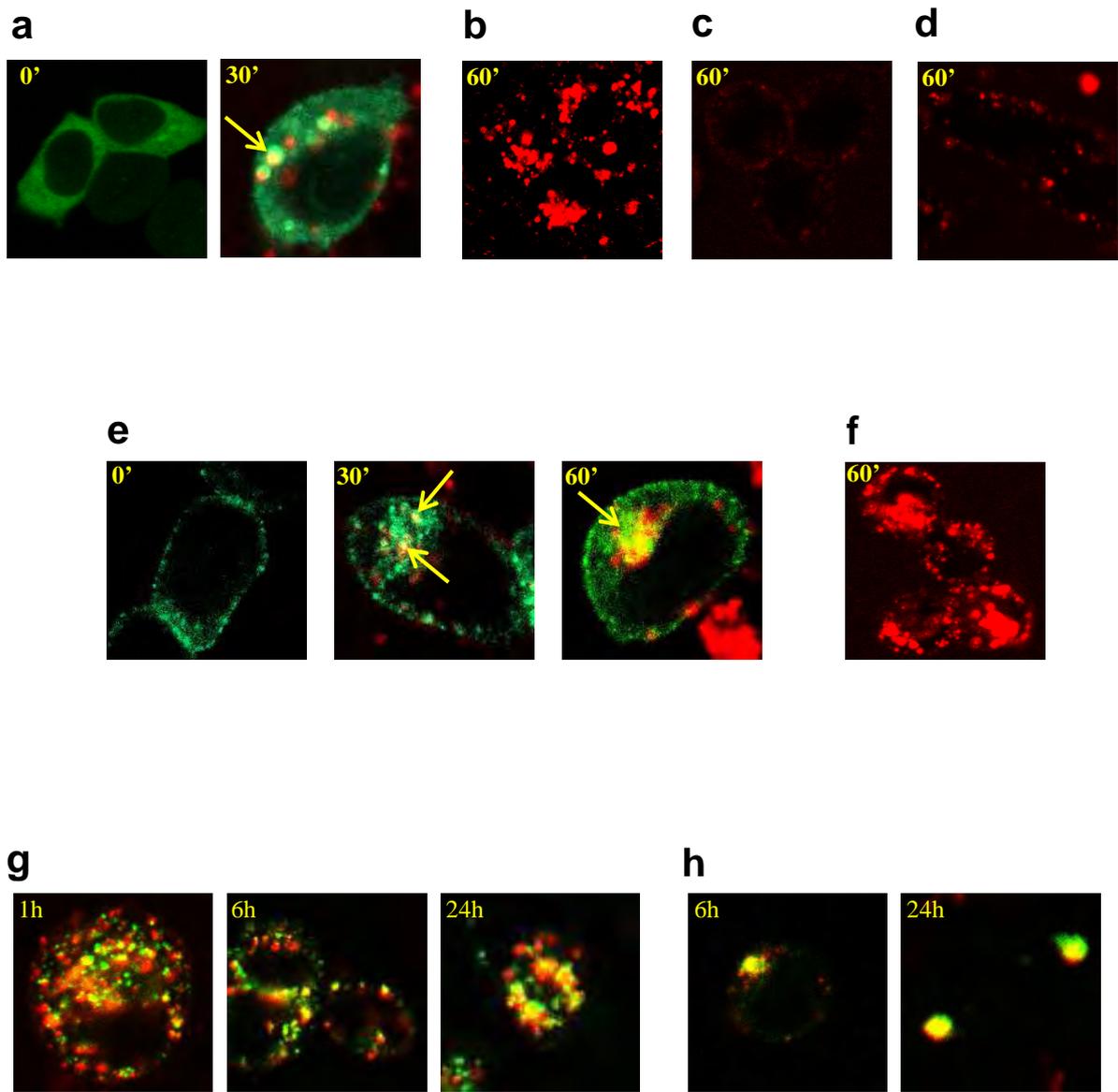


Fig. 8

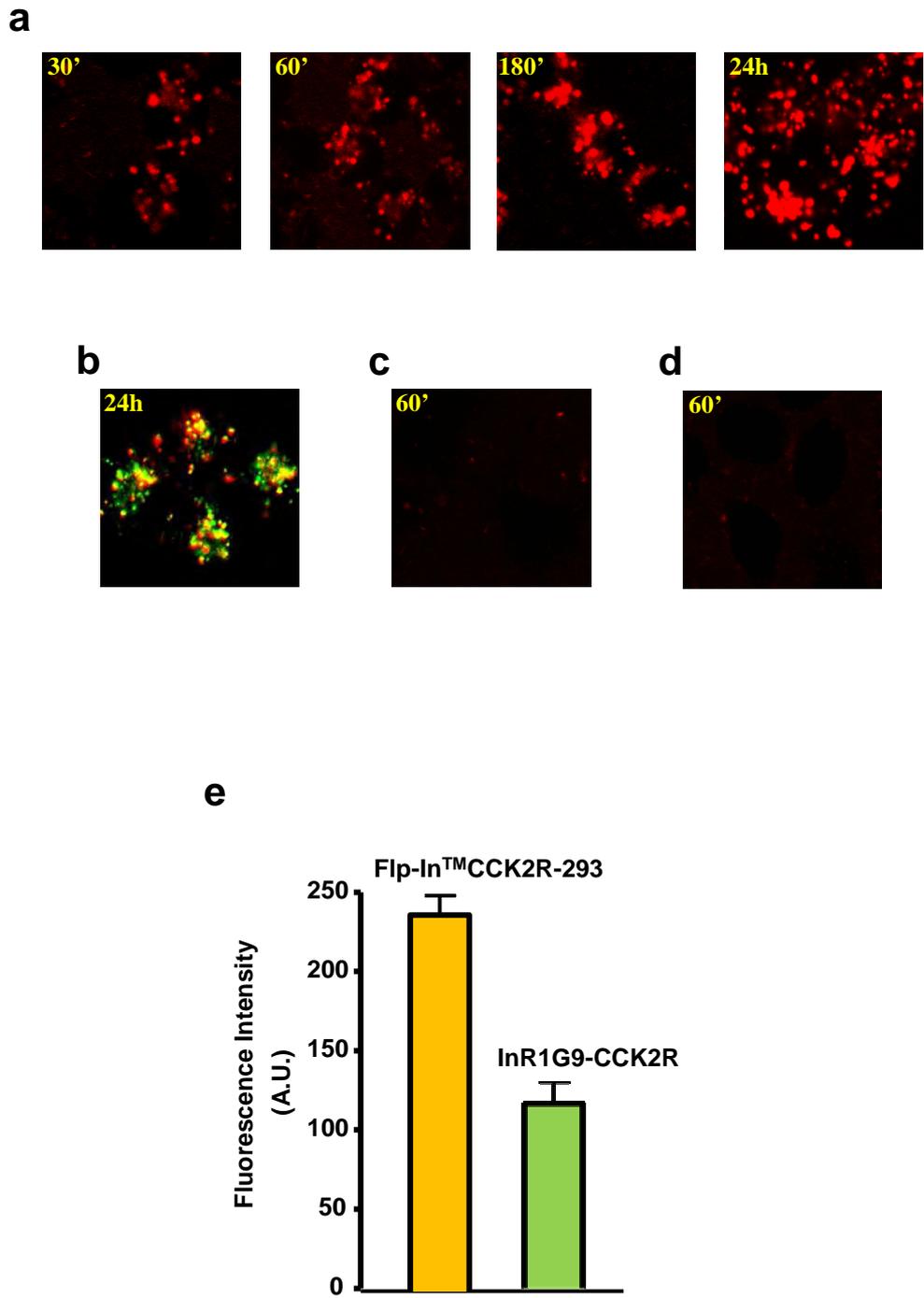


Fig. 9

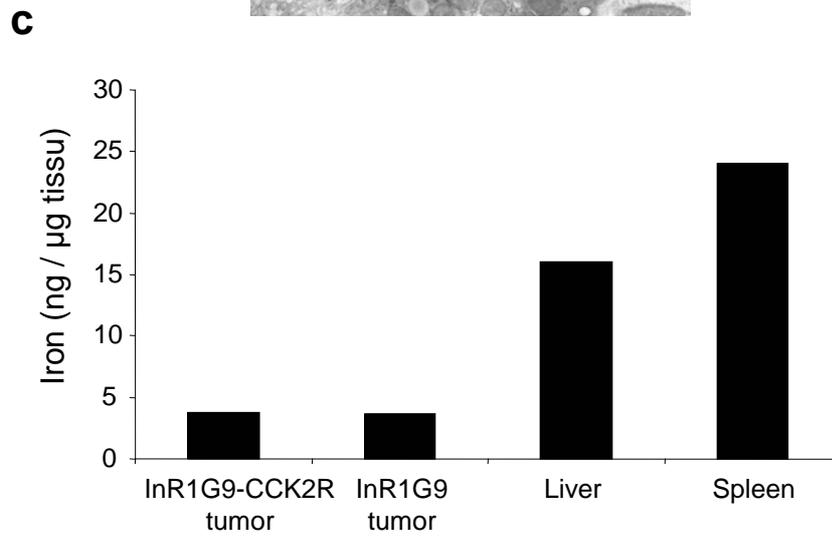
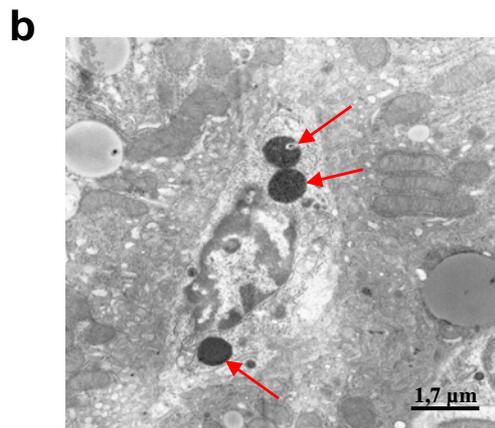
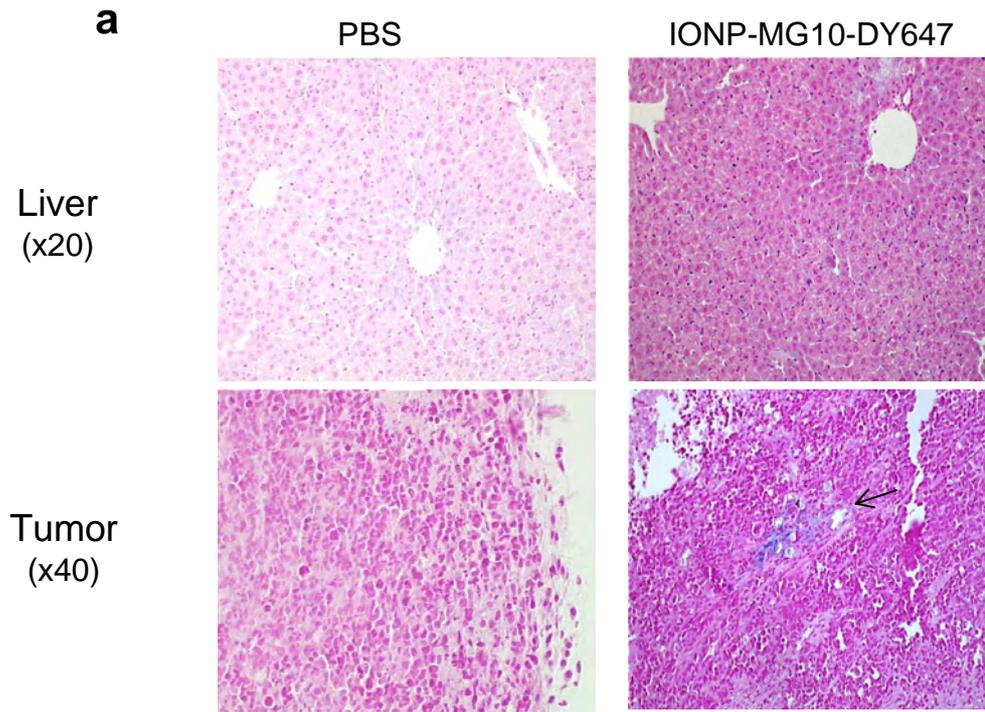


Fig. 10

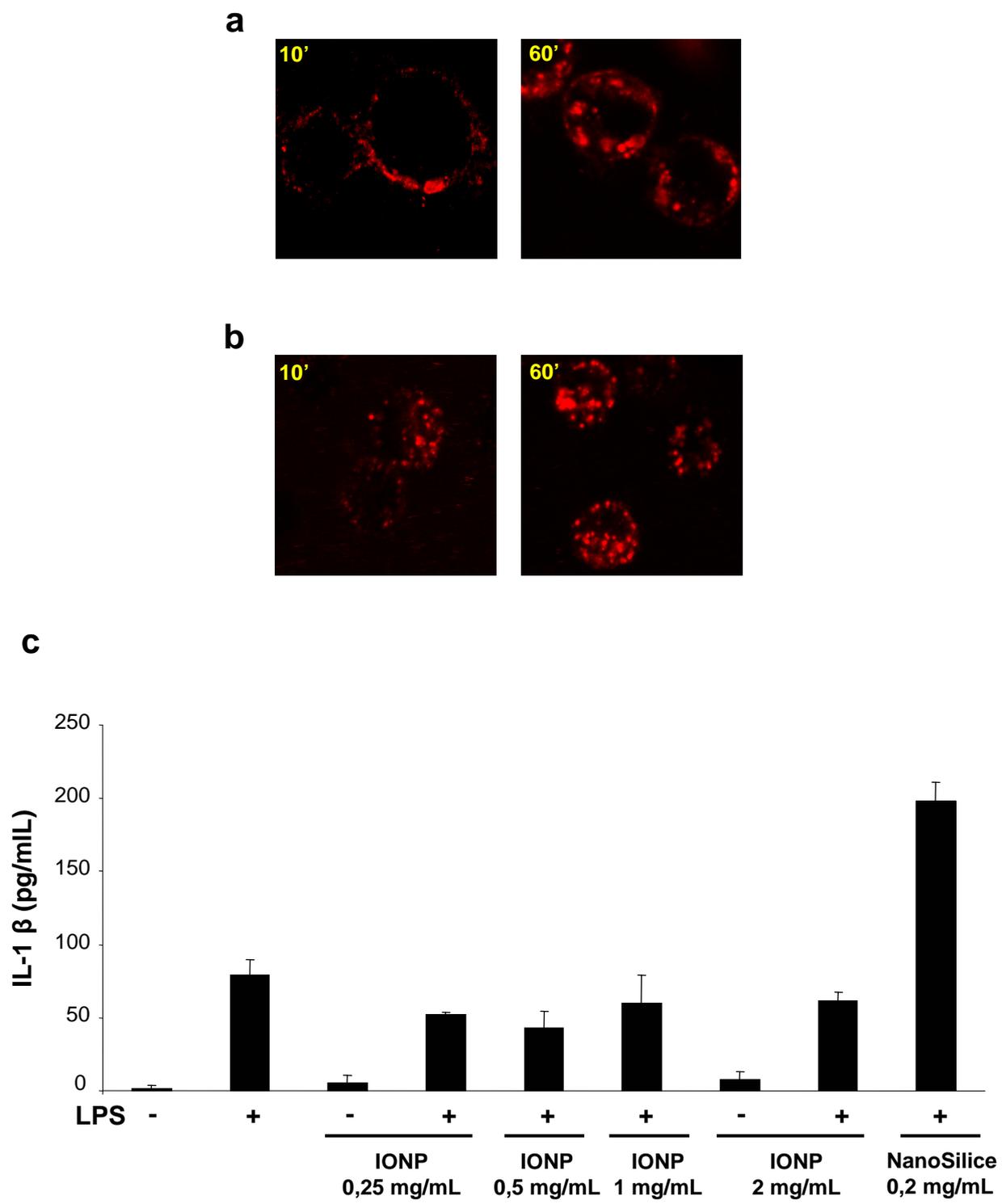
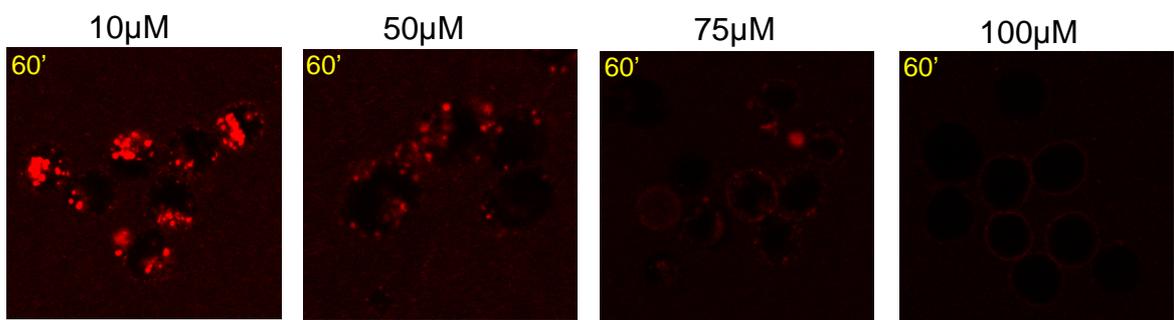


Fig. 11



Supplementary data Fig. S1

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Variations des paramètres de couplage pour améliorer le ciblage des nanoparticules vectorisées.

Les résultats concernant la biodistribution des nanoparticules vectorisées décrits dans l'article ont montré que l'efficacité de ciblage et la furtivité des nanoparticules n'étaient pas suffisantes. Pour palier à ces problèmes, nous avons réalisé des expériences préliminaires en faisant varier les paramètres de vectorisation, comme indiqué dans le tableau de la figure A.1. Le couplage réalisé pour la production des nanoparticules utilisées dans l'article (appelées IONP₄₈₀-DY647-Cys dans le tableau) implique la réaction de l'agent de pontage en excès théoriquement d'un facteur 20 par rapport à la MG10 (soit 480 SM(PEG)₈ théoriques par nanoparticules). Puis les fonctions réactives libres de l'agent de pontage ont été saturées avec de la cystéine.

Dans un premier temps, nous avons cherché à diminuer la taille globale des nanoparticules, en supprimant le fluorochrome et en diminuant la quantité d'agent de pontage SM(PEG)₈ d'un facteur 4. La cystéine a également été supprimée (Fig. A.1). La charge des nanoparticules influençant sa reconnaissance par le système réticulo-endothélial (RES), nous avons neutralisé les groupements amines présents à la surface du PEG des nanoparticules grâce à la réaction avec le composé chimique SMC (Fig. A.1).

La figure A.2 montre que la modification des paramètres a permis d'améliorer l'internalisation des nanoparticules dans les cellules INR-RCCK2 par rapport aux conditions de couplage initiales (IONP₄₈₀-DY647-Cys). Les couplages IONP₁₂₀-Cys et IONP₄₈₀- se distinguent particulièrement *in vitro* pour l'efficacité de leur ciblage sur les cellules INR-RCCK2 et leur faible marquage sur des cellules INR qui n'expriment pas le RCCK2. Ces couplages ont donc été sélectionnés pour être injectés *in vivo*. Des études plus approfondies seront nécessaires pour pouvoir conclure sur l'impact de la taille hydrodynamique, de la charge et de l'hydrophobicité de ces nanoparticules sur leur interaction avec les cellules INR. L'étude de la répartition des nanoparticules chez les souris nudes transplantées avec des xénogreffes de cellules INR-RCCK2 confirme les données obtenues sur les cellules. En effet, les nouveaux couplages sont plus furtifs et s'accumulent de façon plus importante dans la tumeur. Il faudra cependant vérifier que l'accumulation des nanoparticules dans la tumeur dépend de la vectorisation et non de l'effet EPR, chez des souris portant des tumeurs qui n'expriment pas le RCCK2.

Ces résultats préliminaires sont très prometteurs, et soulignent l'importance de la chimie de surface sur la biodistribution des nanoparticules d'oxyde de fer.

Effet de l'hyperthermie générée par un champ magnétique alternatif sur les cellules INR-RCCK2 contenant les MG10-IONP-DY647.

Lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique alternatif, les nanoparticules d'oxyde de fer ont la capacité de produire localement de la chaleur. Les cellules cancéreuses étant sensibles à l'augmentation de la température, cette propriété est utilisée pour induire la destruction des tissus cancéreux qui contiennent les nanoparticules. La mesure de la capacité calorifique des nanoparticules utilisées dans cette étude, définie par le SAR (Specific Absorption Rate), donne une valeur de 18,47 W/g dans les conditions de champ qui seront appliquées aux cellules, c'est-à-dire à une fréquence de 56 kHz et un champ alternatif d'une amplitude 50 mT. De plus, la température de la suspension de nanoparticules a augmenté de 2 à 3°C en 100 secondes, ce qui signifie qu'elles sont capables de générer de la chaleur en solution.

Nous avons préalablement montré que les nanoparticules vectorisées s'accumulaient dans les lysosomes. Nous avons donc analysé la déstabilisation de la membrane des lysosomes de cellules contenant les nanoparticules lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique alternatif (Fig. C.2). En condition d'hyperthermie, on n'observe pas de diminution de la fluorescence rouge de l'acridine orange, ce qui signifie qu'il n'y a pas de fuite du contenu lysosomal dans le cytoplasme. Au contraire, l'intensité de fluorescence augmente pour les cellules qui contiennent les nanoparticules, indépendamment de la présence du champ magnétique, ce qui reflète vraisemblablement une augmentation de la taille des lysosomes. D'autre part la baisse générale de la fluorescence observée au bout de 48h peut s'expliquer par le photo-blanchiment du fluorochrome présent dans la cellule.

L'hyperthermie n'affecte pas non plus la viabilité des cellules INR-RCCK2 qui contiennent les nanoparticules (Fig. C.3). On note également que les nanoparticules ne sont pas toxiques pour les cellules aux concentrations utilisées, c'est-à-dire à 25 et 100 µg Fer/mL (cette dernière n'est pas montrée ici), pendant 72h.

Dans les conditions utilisées dans cette étude, les nanoparticules vectorisées n'induisent de mort cellulaire. Les améliorations nécessaires sont discutées dans la section suivante.

Légendes des figures.

Fig A : Modification des paramètres de vectorisation des nanoparticules et ciblage des cellules INR-RCCK2 *in vitro*.

(1) **Tableau récapitulatif des modifications des paramètres de couplages.** Le couplage IONP480-Dy647-Cys correspond aux nanoparticules MG10-IONP-DY647 utilisées dans l'article précédent. Les réactions ont été réalisées comme décrites dans le matériel et méthode de l'article. Le SM(PEG)₈ est l'agent de pontage utilisé pour le couplage du peptide MG10 à la nanoparticule. Le SMC (N-succinimidyl N-méthylcarbamate, Sigma) a été ajouté en fin de réaction à une concentration de 12 mM pendant 45 min à température ambiante.

(2) **Ciblage *in vitro* des cellules INR exprimant ou non le RCCK2 par les nouveaux couplages de nanoparticules.** Les cellules INR et INR-RCCK2 ont été incubées avec les nanoparticules pendant 3h à 37°C. Les cellules ont été digérées et les nanoparticules dissoutes avec de l'acide chlorhydrique 5N pendant 24h à 37°C. Le fer libéré par les nanoparticules associées aux cellules a été dosé comme décrit dans l'article.

Fig B : Ciblage *in vivo* des cellules INR-RCCK2 par les nouveaux couplages de nanoparticules. L'injection des nanoparticules et le dosage du fer contenu dans les tissus ont été réalisés comme décrits dans l'article.

Fig C : Cellules INR-RCCK2 incubées avec MG10-IONP-DY647 et soumises à un traitement d'hyperthermie.

Le champ magnétique alternatif est généré par une bobine insérée dans un circuit résonnant relié à un amplificateur de puissance 0,5kW. La fréquence appliquée est de 56 kHz, et l'amplitude de 55mT. La température est maintenue constante à l'intérieur de la bobine (37°C) grâce à un système d'aspiration. La température est contrôlée en continu à l'aide de sondes optiques insensibles à la présence d'un magnétique alternatif (Neoptix Reflex 4) qui sont placées à l'intérieur et à l'extérieur du tube.

(1) **Détermination du SAR (Specific Absorption Rate) de la suspension de nanoparticules.** Pour des mesures précises de SAR, la bobine est remplacée par un électroaimant (entrefer d=1,3cm). Les mesures de température de l'échantillon de nanoparticules (12mg Fer/mL dans NaCl 150 mM) et du blanc (NaCl 150 mM) sont réalisées

à différentes amplitudes de champs (1,7mT à 60,6mT) pendant 100 secondes. Les variations de température permettent le calcul du SAR (W/g) avec la formule suivante :

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

avec C_{pi} : capacités calorifiques des éléments du système ($C_{pi,polypropylène} = 1800 \text{ J.kg}^{-1}.\text{K}^{-1}$, $C_{pi,IONP} = 746 \text{ J.kg}^{-1}.\text{K}^{-1}$, $C_{pi,eau} = 4186 \text{ J.kg}^{-1}.\text{K}^{-1}$); m_i : masse des éléments du système ($m_{polypropylène} = 1,2\text{g}$, $m_{eau} = 2\text{g}$, $m_{IONP} = 2,37\text{mg}$); $m_{magn} = m_{IONP} = 2,37\text{mg}$; ΔT : la hausse de température (K); Δt : temps de mesure (100s).

La figure représente l'évolution du SAR en fonction de l'amplitude du champ appliqué pour une fréquence de 56kHz. Les cercles noirs représentent les mesures expérimentales et la ligne rouge l'ajustement de la puissance du champ $\mu_0 H_{app}$.

(2, 3) Application du champ magnétique alternatif sur les cellules INR-RCCK2 chargées en nanoparticules.

(2) Détermination de la perméabilisation membranaire des lysosomes. Après un marquage à l'acridine orange (5 μM pendant 15 min à 37°C, Sigma), les cellules INR-RCCK2 ont été incubées avec les MG10-IONP-DY647 (0.25 μg Fer/mL) pendant 24h. Puis les cellules ont été lavées, mises en suspension dans 3mL de milieu complet et soumises au champ magnétique alternatif pendant 1h à 37°C. La fluorescence rouge de l'acridine orange a été quantifiée par cytométrie en flux.

(3) Détermination de la mort cellulaire. Les cellules INR-RCCK2 ont été incubées avec les MG10-IONP-DY647 (0.25 μg Fer/mL) pendant 24h. Puis elles ont été lavées, mises en suspension dans 3mL de milieu complet et soumises au champ magnétique alternatif pendant 1h à 37°C. La mort cellulaire a été déterminée grâce à un marquage avec de l'annexine V-FITC et de l'iodure de propidium pendant 10 min à 4°C (AbCys, Paris, France).

(1)

	DY647	Quantité SM(PEG) ₈	Cystéine	SMC
IONP ₄₈₀ -DY647-Cys	+	480	+	-
IONP ₄₈₀ -Cys	-	480	+	-
IONP ₁₂₀ -Cys	-	120	+	-
IONP ₄₈₀ ⁻	-	480	-	-
IONP ₁₂₀ ⁻	-	120	-	-
IONP ₄₈₀ -SMC	-	480	-	+
IONP ₁₂₀ -SMC	-	120	-	+

(2)

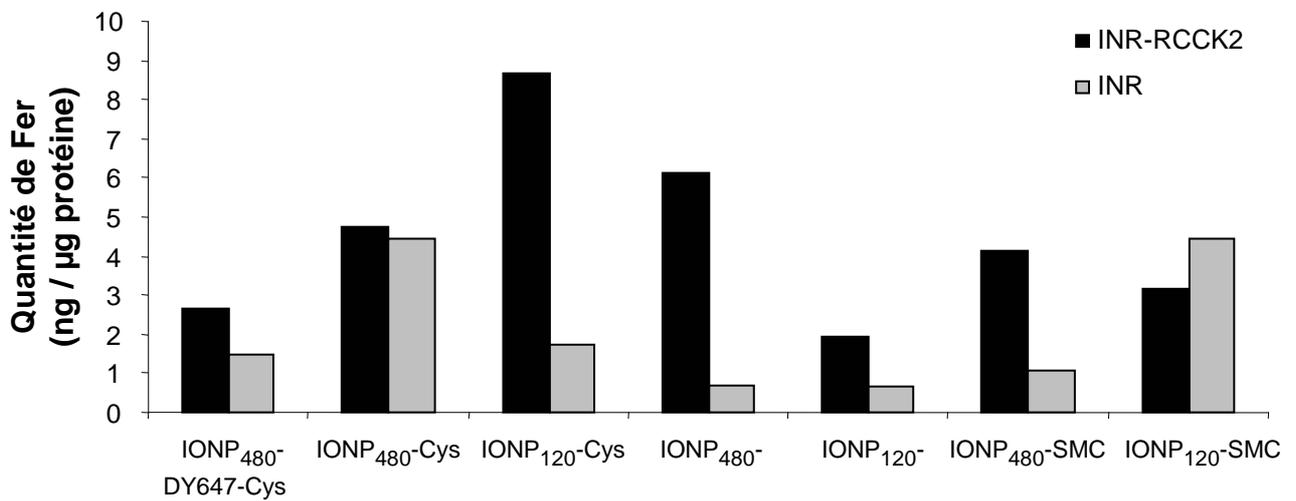


Fig. A

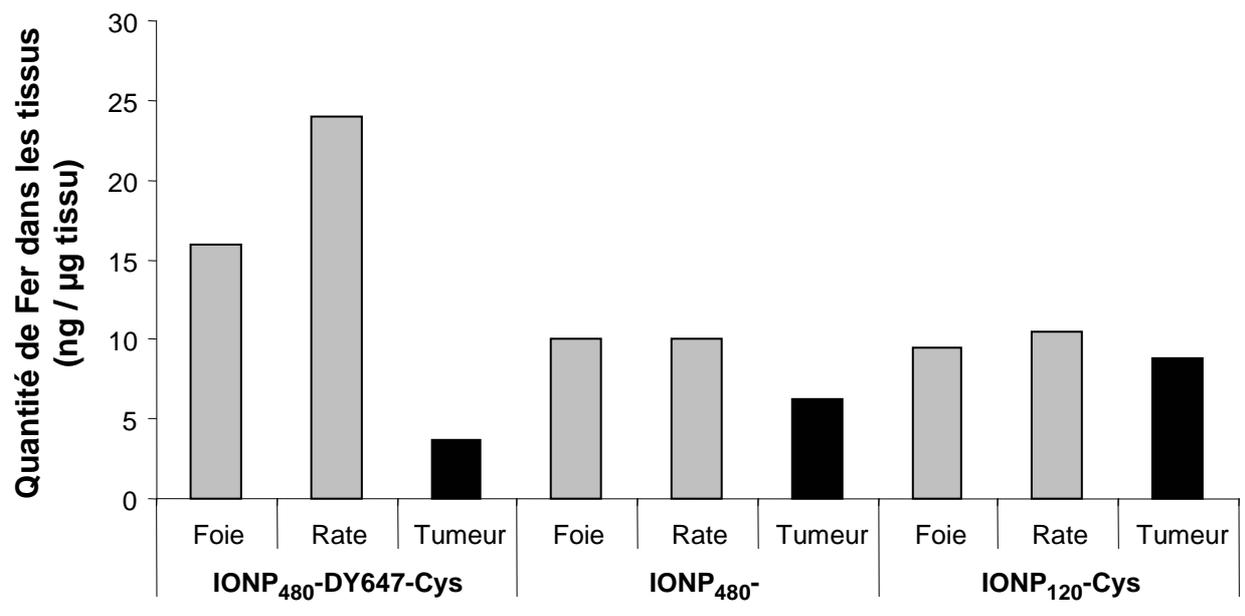
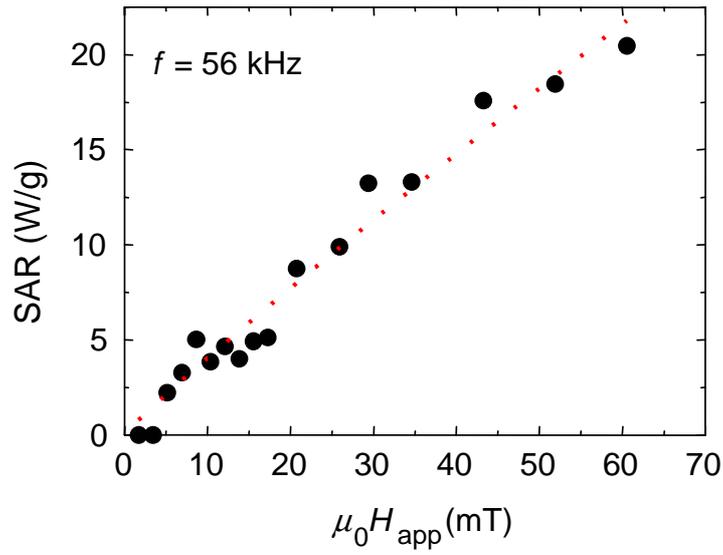
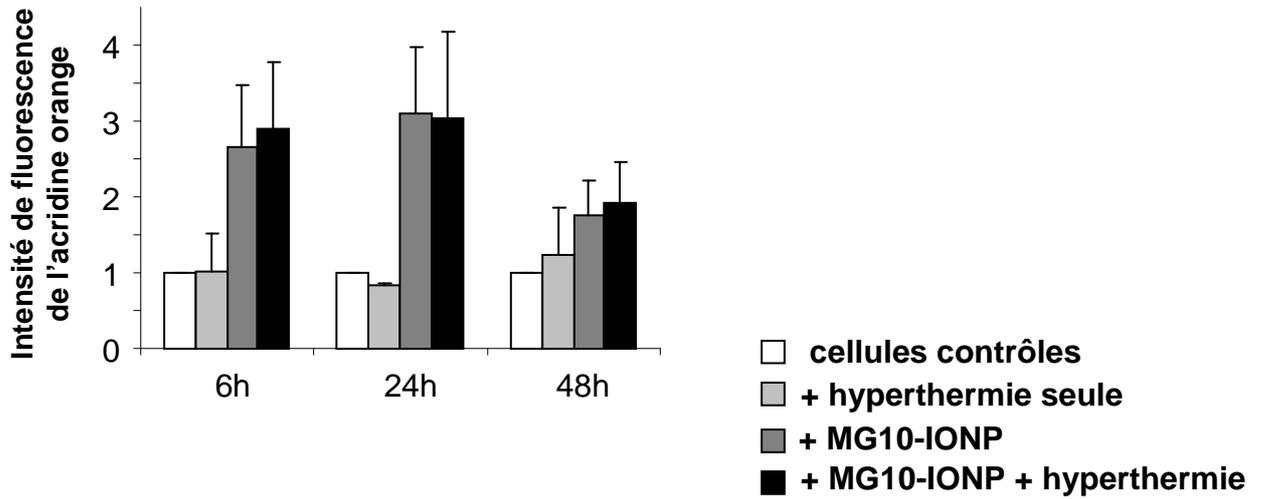


Fig. B

(1)



(2)



(3)

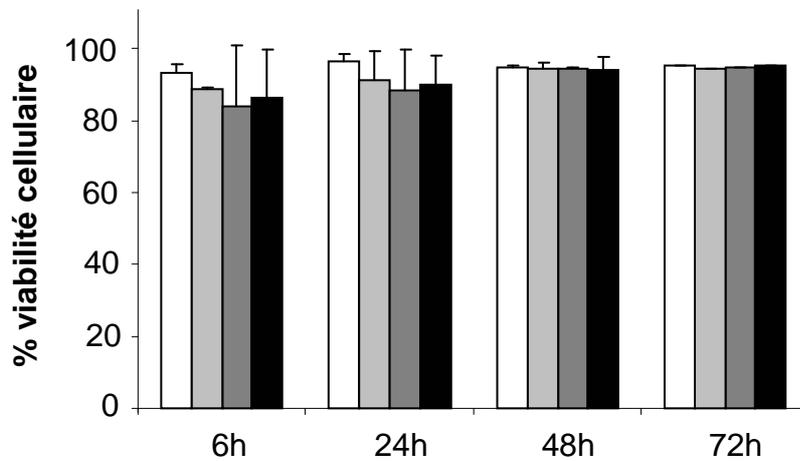


Fig. C

DISCUSSION

L'objectif de ces travaux était de conjuguer la gastrine avec des nanoparticules magnétiques afin de cibler les cellules qui expriment le récepteur CCK2 *in vitro* et *in vivo*. Pour cela, nous avons utilisé des nanoparticules d'oxyde de fer d'une dizaine de nanomètres enrobées d'un PEG afin de limiter leur reconnaissance par le système réticulo-endothélial (RES) et favoriser la prolongation de leur demi-vie plasmatique. L'enrobage de PEG a également permis la liaison covalente de la gastrine grâce à la présence de groupements amines. De plus, nous avons ajouté une molécule fluorescente sur les nanoparticules afin de faciliter leur détection en microscopie.

Caractérisation des mécanismes d'internalisation des nanoparticules vectorisées

La première partie de ces travaux a consisté à déterminer les mécanismes d'internalisation des nanoparticules vectorisées dans le modèle cellulaire HEK-FlpIn transfecté de manière stable avec le récepteur CCK2 (HEK-RCCK2). Les observations de microscopie confocale ont confirmé que l'internalisation des nanoparticules dans les cellules était essentiellement dépendante de la présence du RCCK2. Cependant, une proportion non négligeable des nanoparticules (20-30%) est capable d'entrer de façon non spécifique dans les cellules qui n'expriment pas le récepteur. L'endocytose des nanoparticules par pinocytose suite à leur interaction non spécifique avec la membrane plasmique peut être limitée en modifiant leurs propriétés de surface. Il serait intéressant de déterminer la part d'internalisation non spécifique des nanoparticules vectorisées sur les cellules qui expriment le récepteur. En effet, la formation d'un nombre important de vésicules d'endocytose suite à l'activation du RCCK2 peut modifier l'endocytose non spécifique des nanoparticules dans ces cellules par rapport aux cellules sans récepteur. La part de l'internalisation non spécifique pourrait expliquer pourquoi la courbe représentant la cinétique de captation des nanoparticules par les cellules HEK-RCCK2 n'atteint pas de plateau au bout de 3h, contrairement au ligand libre. Une cinétique plus longue permettrait déterminer si l'internalisation des nanoparticules est un phénomène saturable.

Par ailleurs, nous avons constaté que la présence de la nanoparticule modifiait la cinétique de l'internalisation et du trafic intracellulaire du RCCK2. Tout d'abord, le ligand conjugué aux nanoparticules rentre plus lentement dans les cellules que le ligand seul. D'autre part, dans les vésicules d'endocytose, le récepteur se sépare plus rapidement des

nanoparticules vectorisées. Nous avons cherché à déterminer les conséquences de la libération précoce du RCCK2 sur son adressage aux voies de recyclage membranaire. Des expériences de co-localisation avec la protéine Rab11 ont montré que, lorsque le récepteur est stimulé par les nanoparticules, sa localisation dans les vésicules de recyclage est plus rapide. Malheureusement, nous n'avons pas pu déterminer si ce phénomène se traduisait par un recyclage plus abondant du récepteur à la membrane plasmique, les variations du nombre de récepteurs membranaires étant trop faibles pour obtenir des résultats significatifs. Une autre étude rapporte que la nanoconjugaison de quantum dots avec un anticorps dirigé contre le récepteur de l'EGF modifie la répartition de l'anticorps entre les différents compartiments cellulaires [290]. Il faut donc rester prudent dans l'utilisation de ce type de nanoparticules en tant que sonde fluorescente pour étudier le trafic intracellulaire de molécules, comme cela a été fait dans le cas du récepteur de la sérotonine [368].

En revanche, notre travail montre que si les nanoparticules sont capables d'interférer dans la cinétique du trafic intracellulaire du RCCK2, elles ne modifient pas les mécanismes impliqués dans l'internalisation. En effet, l'activation du RCCK2 par les nanoparticules vectorisées va provoquer leur internalisation par la voie dépendante de la clathrine, suite au recrutement de la β -arrestine 2. La dynamine intervient également pour permettre la scission des vésicules endocytose. Les travaux menés précédemment dans l'équipe ont montré qu'il n'y avait pas de différence dans le recrutement de la β -arrestine 1 ou 2, cependant des observations complémentaires sont nécessaires pour s'assurer que cela s'applique également aux nanoparticules vectorisées.

Ciblage du RCCK2 *in vivo*

L'accumulation intracellulaire des nanoparticules est primordiale pour leur utilisation dans des applications biomédicales. Les observations de microscopie confocale et électronique confirment que les nanoparticules sont internalisées massivement et de façon durable dans les cellules. Ce phénomène a été observé sur les cellules HEK-RCCK2 et sur la lignée cellulaire tumorale endocrine pancréatique INR1G9. Il s'agit de cellules issues d'un glucagonome de hamster, qui ont été transfectées de manière stable avec le RCCK2 (INR-RCCK2). Cette lignée tumorale a été utilisée pour la génération de tumeurs qui surexpriment le RCCK2 *in vivo*.

Les paramètres essentiels pour l'accumulation tumorale des nanoparticules *in vivo* reposent sur leur furtivité dans la circulation sanguine et l'efficacité de ciblage de la vectorisation. De nombreuses études rapportent que l'enrobage de PEG limite l'adsorption

des protéines plasmatiques à la surface des nanoparticules et leur captation par les cellules immunitaires. Afin de réaliser la vectorisation des nanoparticules, nous avons utilisé un PEG qui porte des groupements amines (positivement chargé). Or les charges positives sont décrites comme favorisant la reconnaissance des nanoparticules par les macrophages. C'est pourquoi, lors des réactions permettant le couplage de la gastrine sur les nanoparticules, l'agent de pontage a été utilisé en excès, occupant théoriquement la totalité des groupements amines à la surface du PEG. A la fin du couplage, les fonctions maléimides de l'agent de pontage qui n'ont pas réagi avec la gastrine ont été saturées avec des cystéines. Ces cystéines procurent une charge globale zwitterionique, indépendamment des charges et de l'hydrophobicité de la gastrine et du fluorochrome.

Néanmoins, comme cela a été décrit pour d'autres études, une part importante des nanoparticules injectées chez les souris s'accumulent dans le foie et la rate, ce qui signifie qu'elles sont majoritairement reconnues par le système RES [369, 370]. Il est possible que cela provienne de l'adsorption des protéines plasmatiques, comme le montre l'augmentation du diamètre hydrodynamique des nanoparticules en présence de sérum. De plus, ces mesures révèlent l'agrégation des nanoparticules, il est donc probable que leur taille supérieure à 100 nm limite leur extravasation vers la tumeur, et favorise leur reconnaissance par le RES. En effet, les nanoparticules sont abondamment endocytées par les macrophages en culture. Cependant, elles n'induisent pas de réaction inflammatoire dans ces cellules, en accord avec les données de la littérature concernant leur biocompatibilité [327]. De plus, leur incubation avec les cellules INR-RCCK2 n'induit pas de mort cellulaire pendant 72h. Elles ne sont donc pas toxiques pour ces cellules à une concentration de 0.1 mg Fer/mL. Il faudrait vérifier cela pour des concentrations plus élevées, et sur des temps plus longs, car le métabolisme des nanoparticules d'oxyde de fer chez l'animal est un phénomène lent (plusieurs mois) [321].

D'autre part, aucune différence significative n'a été détectée concernant la quantité de nanoparticules dans les tumeurs qui expriment le RCCK2 et celles qui ne l'expriment pas. Ce phénomène peut être lié à la faible efficacité de ciblage des nanoparticules. En effet, les nanoparticules vectorisées MG10-IONP-DY647 se comportent comme si elles possédaient seulement 2 peptides à leur surface pour activer le RCCK2. Ce paramètre a été amélioré grâce à l'optimisation des paramètres de couplage, qui a produit des résultats préliminaires encourageants *in vitro* et *in vivo*. La modification de la chimie de surface a également permis d'améliorer la furtivité des nanoparticules chez la souris. Des études complémentaires sont nécessaires afin d'approfondir ces données. D'autre part, afin de mieux comprendre l'accumulation des nanoparticules vectorisées dans les tumeurs il serait intéressant de

déterminer le type cellulaire dans lequel elles sont internalisées. En effet, il semblerait que l'accumulation des nanoparticules dans la tumeur soit essentiellement liée à l'effet EPR, néanmoins leur vectorisation est importante pour permettre leur internalisation dans les cellules tumorales qui expriment le RCCK2 (Figure 16). Cette internalisation est primordiale pour des applications thérapeutiques.

Traitement par hyperthermie sur des cellules tumorales

Après leur internalisation, les nanoparticules vectorisées avec la gastrine sont adressées aux lysosomes dans les deux types de modèles cellulaires utilisés. Malgré cette localisation, aucune perméabilisation de la membrane lysosomiale n'a été observée lorsque les cellules INR-RCCK2 sont placées dans un champ magnétique alternatif. Au contraire, la fluorescence rouge de l'acridine orange, qui reflète sa localisation dans les lysosomes, augmente dans les cellules contenant les nanoparticules. Cela pourrait s'expliquer par l'augmentation de la taille des vésicules contenant les nanoparticules qui a été observée en microscopie électronique, et qui pourrait résulter de la fusion des lysosomes.

De plus, les autres voies de mort cellulaire ne sont pas non plus activées, car on n'observe pas de modification de la viabilité des cellules en présence du champ magnétique alternatif. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'absence d'effet toxique des nanoparticules en condition d'hyperthermie. Il est possible que la quantité de nanoparticules dans les cellules ne soit pas suffisante, comme cela a été décrit dans une autre étude (~ 1pg Fer/cellule), alors que la viabilité de cellules contenant 17 pg fer était réduite à 62% en présence d'un champ magnétique alternatif [371]. L'optimisation des paramètres de vectorisation doit être poursuivie afin d'augmenter la quantité de nanoparticules internalisées. Par ailleurs, des essais sur les cellules HEK-RCCK2, qui internalisent deux fois plus de nanoparticules, proportionnellement au nombre de récepteurs qu'elles expriment, pourraient être plus prometteurs que sur la lignée INR-RCCK2. Il est également possible que la sensibilité à la chaleur soit dépendante du type cellulaire.

D'autre part, la valeur relativement faible que nous avons obtenue pour le SAR pourrait être insuffisante pour générer une augmentation significative de la température dans les cellules. En effet, en dessous de 42°C, les effets sont négligeables [372]. L'utilisation de nanoparticules dont la valeur du SAR était supérieure à la notre a diminué la viabilité de différents types cellulaires de 15 à 90% en fonction des études [245, 372, 373]. Le SAR dépend essentiellement de deux facteurs : les conditions employées pour la génération du champ magnétique alternatif, et les propriétés physico-chimiques des nanoparticules [243].

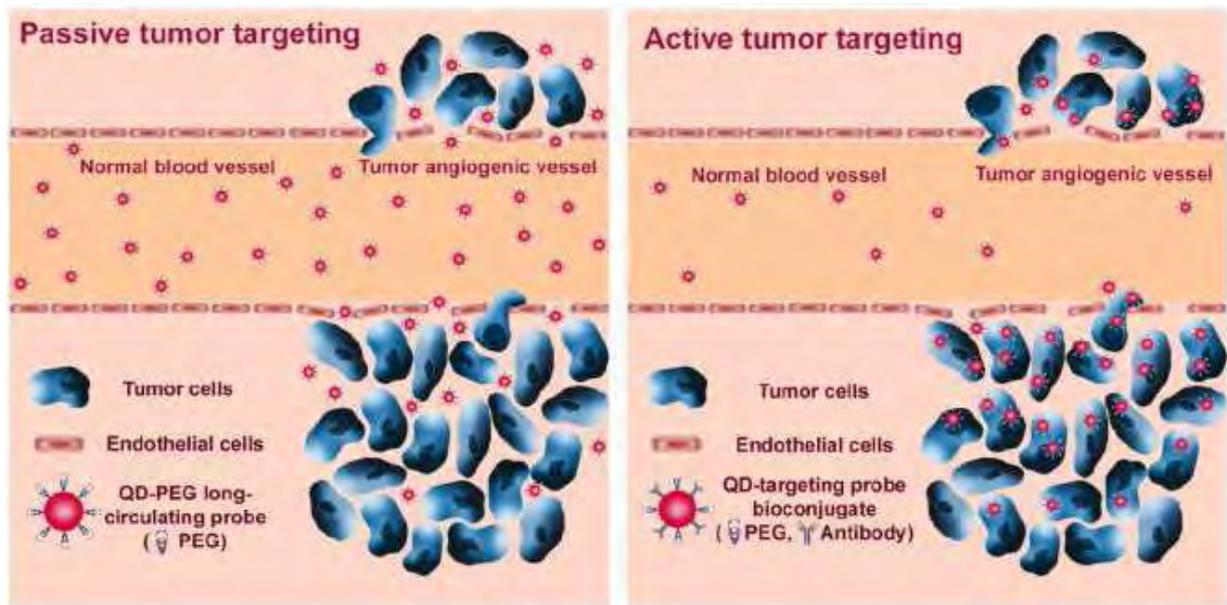


Figure 16: Schéma d'adressage passif et actif de nanoparticules.

Extravasation et rétention de nanoparticules grâce à la perturbation de la vascularisation tumorale (adressage passif), et internalisation spécifique de nanoparticules vectorisées (adressage actif) [374].

Pour augmenter la température produite par nos nanoparticules, nous devons donc optimiser la fréquence et l'amplitude du champ appliqué sur les cellules. Si cela ne suffit pas, nous devons envisager d'utiliser un autre système, c'est-à-dire des nanoparticules dont les propriétés sont plus adaptées à une application pour l'hyperthermie. La taille de la nanoparticule est primordiale pour la capacité de chauffe des nanoparticules (article de J. Carrey, B. Mehdaoui, M. Respaud, Simple models for dynamic hysteresis loop calculations of magnetic single-domain nanoparticles: Application to magnetic hyperthermia optimization, (2011) J. Appl. Phys. 109, 083921). En effet, une étude rapporte qu'une différence de quelques nanomètres dans la taille du cœur de la nanoparticule modifie drastiquement les effets sur la viabilité des cellules [375]. D'autres paramètres sont également à prendre en compte, tel que l'enrobage, la taille hydrodynamique et la dispersion des nanoparticules [243]. En effet, en présence de sérum les nanoparticules ont tendance à s'agréger, ce qui diminue la perte de chaleur [376].

Enfin, des travaux rapportent que, malgré l'utilisation de nanoparticules dont la valeur du SAR est dix fois supérieure à la notre, le traitement par hyperthermie n'a provoqué qu'une faible baisse de la viabilité cellulaire (15%), alors que la combinaison au cisplatine a diminué la viabilité cellulaire de 76%. L'hyperthermie seule n'est donc pas toujours efficace sur les cellules, même lorsque les nanoparticules provoquent une augmentation de la température de 10°C en solution [245]. C'est pourquoi nous envisageons de rajouter une molécule cytotoxique à la surface des nanoparticules vectorisées avec la gastrine, qui sera liée de manière covalente grâce à une séquence reconnue par les enzymes lysosomiales [236].

Les travaux de thèse présentés ici constituent donc une preuve de concept qui expose la faisabilité de la vectorisation des nanoparticules magnétiques avec la gastrine. La prochaine étape consistera à valider les résultats obtenus pour les nouveaux paramètres de couplage afin d'améliorer l'efficacité du ciblage in vivo, tout en limitant la reconnaissance des nanoparticules par le système réticulo-endothélial. Les nanoparticules vont également être conjuguées avec une molécule cytotoxique, afin de potentialiser l'action toxique du traitement par hyperthermie. A terme, notre objectif est de pouvoir travailler avec des nanoparticules de fer pur, dont les propriétés magnétiques sont nettement supérieures à celles des oxydes de fer. En attendant que leur chimie de synthèse soit totalement maîtrisée, nous envisageons d'utiliser d'autres nanoparticules d'oxyde de fer, dont les propriétés seraient plus adaptées à une utilisation en hyperthermie. Enfin, l'identification du RGIP en tant que

nouvelle cible pharmacologique dans les tissus tumoraux, nous permettra d'appliquer l'expérience acquise lors de ces travaux pour le développement d'un nouveau système basé sur la vectorisation des nanoparticules magnétiques avec le GIP.

Bibliographie

1. Kaltsas GA, Besser GM, Grossman AB: **The diagnosis and medical management of advanced neuroendocrine tumors.** *Endocr Rev* 2004, **25**(3):458-511.
2. Mitry E, Rougier P: **The treatment of undifferentiated neuroendocrine tumors.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2001, **37**(1):47-51.
3. Starker LF, Carling T: **Molecular genetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors.** *Curr Opin Oncol* 2009, **21**(1):29-33.
4. Lepage C, Bouvier AM, Phelip JM, Hatem C, Vernet C, Faivre J: **Incidence and management of malignant digestive endocrine tumours in a well defined French population.** *Gut* 2004, **53**(4):549-553.
5. Taal BG, Visser O: **Epidemiology of neuroendocrine tumours.** *Neuroendocrinology* 2004, **80** Suppl 1:3-7.
6. Metz DC, Jensen RT: **Gastrointestinal neuroendocrine tumors: pancreatic endocrine tumors.** *Gastroenterology* 2008, **135**(5):1469-1492.
7. Kon T, Wada R, Suzuki R, Nakayama Y, Ebina Y, Yagihashi S: **VIP and Calcitonin-Producing Pancreatic Neuroendocrine Tumor with Watery Diarrhea: Clinicopathological Features and the Effect of Somatostatin Analogue.** *JOP* 2012, **13**(2):226-230.
8. Arciero CA, Bender GN, Shriver CD: **Utility of computed tomographic enteroclysis for the general surgeon(1).** *Curr Surg* 2001, **58**(2):205-208.
9. Dromain C, de Baere T, Lumbroso J, Caillet H, Laplanche A, Boige V, Ducreux M, Duvillard P, Elias D, Schlumberger M *et al*: **Detection of liver metastases from endocrine tumors: a prospective comparison of somatostatin receptor scintigraphy, computed tomography, and magnetic resonance imaging.** *J Clin Oncol* 2005, **23**(1):70-78.
10. Bhutani MS, Hoffman BJ, van Velse A, Hawes RH: **Contrast-enhanced endoscopic ultrasonography with galactose microparticles: SHU508 A (Levovist).** *Endoscopy* 1997, **29**(7):635-639.
11. Reubi JC: **Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy.** *Endocr Rev* 2003, **24**(4):389-427.
12. Rufini V, Calcagni ML, Baum RP: **Imaging of neuroendocrine tumors.** *Semin Nucl Med* 2006, **36**(3):228-247.
13. Reubi JC, Kvols LK, Waser B, Nagorney DM, Heitz PU, Charboneau JW, Reading CC, Moertel C: **Detection of somatostatin receptors in surgical and percutaneous needle biopsy samples of carcinoids and islet cell carcinomas.** *Cancer Res* 1990, **50**(18):5969-5977.
14. Kwekkeboom D, Krenning EP, de Jong M: **Peptide receptor imaging and therapy.** *J Nucl Med* 2000, **41**(10):1704-1713.
15. Schuhmacher J, Zhang H, Doll J, Macke HR, Matys R, Hauser H, Henze M, Haberkorn U, Eisenhut M: **GRP receptor-targeted PET of a rat pancreas carcinoma xenograft in nude mice with a 68Ga-labeled bombesin(6-14) analog.** *J Nucl Med* 2005, **46**(4):691-699.
16. Pelegrin A, Xavier F, Barbet J, Bartholeyns J, Baty D, Buchegger F, Chatal JF, Dufief F, Gurreau D, Gruaz-Guyon A *et al*: **[Immunotargeting of tumors: state of the art and prospects in 2000].** *Bull Cancer* 2000, **87**(11):777-791.
17. Ruzsniwski P, Ish-Shalom S, Wymenga M, O'Toole D, Arnold R, Tomassetti P, Bax N, Caplin M, Eriksson B, Glaser B *et al*: **Rapid and sustained relief from the symptoms of carcinoid syndrome: results from an open 6-month study of the 28-day prolonged-release formulation of lanreotide.** *Neuroendocrinology* 2004, **80**(4):244-251.

18. Bruns C, Lewis I, Briner U, Meno-Tetang G, Weckbecker G: **SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile.** *Eur J Endocrinol* 2002, **146**(5):707-716.
19. Rinke A, Ricci S, Bajetta E, Jelic S: **Pharmacological therapy of neuroendocrine tumors.** *Tumori* 2011, **96**(5):847-857.
20. Moertel CG, Kvols LK, O'Connell MJ, Rubin J: **Treatment of neuroendocrine carcinomas with combined etoposide and cisplatin. Evidence of major therapeutic activity in the anaplastic variants of these neoplasms.** *Cancer* 1991, **68**(2):227-232.
21. Mitry E, Baudin E, Ducreux M, Sabourin JC, Rufie P, Aparicio T, Lasser P, Elias D, Duvillard P, Schlumberger M *et al*: **Treatment of poorly differentiated neuroendocrine tumours with etoposide and cisplatin.** *Br J Cancer* 1999, **81**(8):1351-1355.
22. Ducreux M, Baudin E, Schlumberger M: **[Treatment strategy of neuroendocrine tumors].** *Rev Prat* 2002, **52**(3):290-296.
23. Otte A, Jermann E, Behe M, Goetze M, Bucher HC, Roser HW, Heppeler A, Mueller-Brand J, Maecke HR: **DOTATOC: a powerful new tool for receptor-mediated radionuclide therapy.** *Eur J Nucl Med* 1997, **24**(7):792-795.
24. Kwekkeboom DJ, Teunissen JJ, Bakker WH, Kooij PP, de Herder WW, Feelders RA, van Eijck CH, Esser JP, Kam BL, Krenning EP: **Radiolabeled somatostatin analog [177Lu-DOTA0,Tyr3]octreotate in patients with endocrine gastroenteropancreatic tumors.** *J Clin Oncol* 2005, **23**(12):2754-2762.
25. Bernard BF, Krenning EP, Breeman WA, Rolleman EJ, Bakker WH, Visser TJ, Macke H, de Jong M: **D-lysine reduction of indium-111 octreotide and yttrium-90 octreotide renal uptake.** *J Nucl Med* 1997, **38**(12):1929-1933.
26. Arlt DH, Baur B, Wagner B, Hoppner W: **A novel type of mutation in the cysteine rich domain of the RET receptor causes ligand independent activation.** *Oncogene* 2000, **19**(30):3445-3448.
27. Fialkowski EA, Moley JF: **Current approaches to medullary thyroid carcinoma, sporadic and familial.** *J Surg Oncol* 2006, **94**(8):737-747.
28. Cakir M, Grossman AB: **Medullary thyroid cancer: molecular biology and novel molecular therapies.** *Neuroendocrinology* 2009, **90**(4):323-348.
29. Kapiteijn E, Schneider TC, Morreau H, Gelderblom H, Nortier JW, Smit JW: **New treatment modalities in advanced thyroid cancer.** *Ann Oncol* 2011, **2011**:6.
30. Messina M, Robinson BG: **Technology insight: gene therapy and its potential role in the treatment of medullary thyroid carcinoma.** *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007, **3**(3):290-301.
31. Minn AH, Kayton M, Lorang D, Hoffmann SC, Harlan DM, Libutti SK, Shalev A: **Insulinomas and expression of an insulin splice variant.** *Lancet* 2004, **363**(9406):363-367.
32. Brentjens R, Saltz L: **Islet cell tumors of the pancreas: the medical oncologist's perspective.** *Surg Clin North Am* 2001, **81**(3):527-542.
33. Vaidakis D, Karoubalis J, Pappa T, Piaditis G, Zografos GN: **Pancreatic insulinoma: current issues and trends.** *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010, **9**(3):234-241.
34. Cheng S, Evans WK, Stys-Norman D, Shepherd FA: **Chemotherapy for relapsed small cell lung cancer: a systematic review and practice guideline.** *J Thorac Oncol* 2007, **2**(4):348-354.
35. William WN, Jr., Glisson BS: **Novel strategies for the treatment of small-cell lung carcinoma.** *Nat Rev Clin Oncol* 2011.

36. D'Angelo SP, Pietanza MC: **The molecular pathogenesis of small cell lung cancer.** *Cancer Biol Ther* 2011, **10**(1):1-10.
37. Ji L, Roth JA: **Tumor suppressor FUS1 signaling pathway.** *J Thorac Oncol* 2008, **3**(4):327-330.
38. Deng WG, Wu G, Ueda K, Xu K, Roth JA, Ji L: **Enhancement of antitumor activity of cisplatin in human lung cancer cells by tumor suppressor FUS1.** *Cancer Gene Ther* 2008, **15**(1):29-39.
39. Sleijfer S, Wiemer E, Verweij J: **Drug Insight: gastrointestinal stromal tumors (GIST)--the solid tumor model for cancer-specific treatment.** *Nat Clin Pract Oncol* 2008, **5**(2):102-111.
40. Gramza AW, Corless CL, Heinrich MC: **Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Gastrointestinal Stromal Tumors.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**(24):7510-7518.
41. Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR, Blackstein ME, Shah MH, Verweij J, McArthur G, Judson IR, Heinrich MC, Morgan JA *et al*: **Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial.** *Lancet* 2006, **368**(9544):1329-1338.
42. Reubi JC: **Somatostatin and other Peptide receptors as tools for tumor diagnosis and treatment.** *Neuroendocrinology* 2004, **80** Suppl 1:51-56.
43. Reubi JC, Krenning E, Lamberts SW, Kvols L: **Somatostatin receptors in malignant tissues.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 1990, **37**(6):1073-1077.
44. Sagman U, Mullen JB, Kovacs K, Kerbel R, Ginsberg R, Reubi JC: **Identification of somatostatin receptors in human small cell lung carcinoma.** *Cancer* 1990, **66**(10):2129-2133.
45. Reubi JC, Macke HR, Krenning EP: **Candidates for peptide receptor radiotherapy today and in the future.** *J Nucl Med* 2005, **46** Suppl 1:67S-75S.
46. Reubi JC: **Peptide receptor expression in GEP-NET.** *Virchows Arch* 2007, **451** Suppl 1:S47-50.
47. Reubi JC, Korner M, Waser B, Mazzucchelli L, Guillou L: **High expression of peptide receptors as a novel target in gastrointestinal stromal tumours.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004, **31**(6):803-810.
48. Reubi JC: **Targeting CCK receptors in human cancers.** *Curr Top Med Chem* 2007, **7**(12):1239-1242.
49. Reubi JC, Schaer JC, Waser B: **Cholecystokinin(CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors.** *Cancer Res* 1997, **57**(7):1377-1386.
50. Reubi JC, Waser B, Gugger M, Friess H, Kleeff J, Kayed H, Buchler MW, Laissue JA: **Distribution of CCK1 and CCK2 receptors in normal and diseased human pancreatic tissue.** *Gastroenterology* 2003, **125**(1):98-106.
51. Reubi JC, Wenger S, Schmuckli-Maurer J, Schaer JC, Gugger M: **Bombesin receptor subtypes in human cancers: detection with the universal radioligand (125)I-[D-TYR(6), beta-ALA(11), PHE(13), NLE(14)] bombesin(6-14).** *Clin Cancer Res* 2002, **8**(4):1139-1146.
52. Korner M, Stockli M, Waser B, Reubi JC: **GLP-1 receptor expression in human tumors and human normal tissues: potential for in vivo targeting.** *J Nucl Med* 2007, **48**(5):736-743.
53. Waser B, Rehmann R, Sanchez C, Fourmy D, Reubi JC: **Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptors in most gastroenteropancreatic and bronchial neuroendocrine tumors.** *J Clin Endocrinol Metab* 2011, **97**(2):482-488.
54. Forrer F, Valkema R, Kwekkeboom DJ, de Jong M, Krenning EP: **Neuroendocrine tumors. Peptide receptor radionuclide therapy.** *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007, **21**(1):111-129.

55. Wild D, Macke H, Christ E, Gloor B, Reubi JC: **Glucagon-like peptide 1-receptor scans to localize occult insulinomas.** *N Engl J Med* 2008, **359**(7):766-768.
56. Ginj M, Zhang H, Waser B, Cescato R, Wild D, Wang X, Erchegyi J, Rivier J, Macke HR, Reubi JC: **Radiolabeled somatostatin receptor antagonists are preferable to agonists for in vivo peptide receptor targeting of tumors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(44):16436-16441.
57. Sleight AJ, Stam NJ, Mutel V, Vanderheyden PM: **Radiolabelling of the human 5-HT2A receptor with an agonist, a partial agonist and an antagonist: effects on apparent agonist affinities.** *Biochem Pharmacol* 1996, **51**(1):71-76.
58. Wild D, Fani M, Behe M, Brink I, Rivier JE, Reubi JC, Maecke HR, Weber WA: **First clinical evidence that imaging with somatostatin receptor antagonists is feasible.** *J Nucl Med* 2011, **52**(9):1412-1417.
59. Brom M, Joosten L, Laverman P, Oyen WJ, Behe M, Gotthardt M, Boerman OC: **Preclinical evaluation of 68Ga-DOTA-minigastrin for the detection of cholecystokinin-2/gastrin receptor-positive tumors.** *Mol Imaging* 2011, **10**(2):144-152.
60. Gotthardt M, Behe MP, Grass J, Bauhofer A, Rinke A, Schipper ML, Kalinowski M, Arnold R, Oyen WJ, Behr TM: **Added value of gastrin receptor scintigraphy in comparison to somatostatin receptor scintigraphy in patients with carcinoids and other neuroendocrine tumours.** *Endocr Relat Cancer* 2006, **13**(4):1203-1211.
61. Gregory RA, Tracy HJ: **THE CONSTITUTION AND PROPERTIES OF TWO GASTRINS EXTRACTED FROM HOG ANTRAL MUCOSA.** *Gut* 1964, **5**:103-114.
62. Dockray G, Dimaline R, Varro A: **Gastrin: old hormone, new functions.** *Pflugers Arch* 2005, **449**(4):344-355.
63. Rehfeld JF: **Clinical endocrinology and metabolism. Cholecystokinin.** *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2004, **18**(4):569-586.
64. Seva C, Dickinson CJ, Yamada T: **Growth-promoting effects of glycine-extended progastrin.** *Science* 1994, **265**(5170):410-412.
65. Fourmy D, Gigoux V, Reubi JC: **Gastrin in gastrointestinal diseases.** *Gastroenterology* 2011, **141**(3):814-818 e811-813.
66. Ferrand A, Bertrand C, Portolan G, Cui G, Carlson J, Pradayrol L, Fourmy D, Dufresne M, Wang TC, Seva C: **Signaling pathways associated with colonic mucosa hyperproliferation in mice overexpressing gastrin precursors.** *Cancer Res* 2005, **65**(7):2770-2777.
67. Mutt V, Jorpes E: **Hormonal polypeptides of the upper intestine.** *Biochem J* 1971, **125**(3):57P-58P.
68. Dufresne M, Seva C, Fourmy D: **Cholecystokinin and gastrin receptors.** *Physiol Rev* 2006, **86**(3):805-847.
69. Dockray GJ, Varro A, Dimaline R, Wang T: **The gastrins: their production and biological activities.** *Annu Rev Physiol* 2001, **63**:119-139.
70. Rehfeld JF: **Accurate measurement of cholecystokinin in plasma.** *Clin Chem* 1998, **44**(5):991-1001.
71. Berna MJ, Tapia JA, Sancho V, Jensen RT: **Progress in developing cholecystokinin (CCK)/gastrin receptor ligands that have therapeutic potential.** *Curr Opin Pharmacol* 2007, **7**(6):583-592.
72. Herranz R: **Cholecystokinin antagonists: pharmacological and therapeutic potential.** *Med Res Rev* 2003, **23**(5):559-605.

73. Christophe J, De Neef P, Deschodt-Lanckman M, Robberecht P: **The interaction of caerulein with the rat pancreas. 2. Specific binding of [3H]caerulein on dispersed acinar cells.** *Eur J Biochem* 1978, **91**(1):31-38.
74. Innis RB, Snyder SH: **Distinct cholecystokinin receptors in brain and pancreas.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980, **77**(11):6917-6921.
75. Noble F, Wank SA, Crawley JN, Bradwejn J, Seroogy KB, Hamon M, Roques BP: **International Union of Pharmacology. XXI. Structure, distribution, and functions of cholecystokinin receptors.** *Pharmacol Rev* 1999, **51**(4):745-781.
76. Silvente-Poirot S, Dufresne M, Vaysse N, Fourmy D: **The peripheral cholecystokinin receptors.** *Eur J Biochem* 1993, **215**(3):513-529.
77. Saillan-Barreau C, Dufresne M, Clerc P, Sanchez D, Corominola H, Moriscot C, Guy-Crotte O, Escrieut C, Vaysse N, Gomis R *et al*: **Evidence for a functional role of the cholecystokinin-B/gastrin receptor in the human fetal and adult pancreas.** *Diabetes* 1999, **48**(10):2015-2021.
78. Soll AH, Amirian DA, Thomas LP, Reedy TJ, Elashoff JD: **Gastrin receptors on isolated canine parietal cells.** *J Clin Invest* 1984, **73**(5):1434-1447.
79. Kopin AS, Lee YM, McBride EW, Miller LJ, Lu M, Lin HY, Kolakowski LF, Jr., Beinborn M: **Expression cloning and characterization of the canine parietal cell gastrin receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**(8):3605-3609.
80. Wank SA, Pisegna JR, de Weerth A: **Brain and gastrointestinal cholecystokinin receptor family: structure and functional expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**(18):8691-8695.
81. Lee YM, Beinborn M, McBride EW, Lu M, Kolakowski LF, Jr., Kopin AS: **The human brain cholecystokinin-B/gastrin receptor. Cloning and characterization.** *J Biol Chem* 1993, **268**(11):8164-8169.
82. Huppi K, Siwarski D, Pisegna JR, Wank S: **Chromosomal localization of the gastric and brain receptors for cholecystokinin (CCKAR and CCKBR) in human and mouse.** *Genomics* 1995, **25**(3):727-729.
83. Silvente-Poirot S, Escrieut C, Wank SA: **Role of the extracellular domains of the cholecystokinin receptor in agonist binding.** *Mol Pharmacol* 1998, **54**(2):364-371.
84. Fourmy D, Zahidi A, Fabre R, Guidet M, Pradayrol L, Ribet A: **Receptors for cholecystokinin and gastrin peptides display specific binding properties and are structurally different in guinea-pig and dog pancreas.** *Eur J Biochem* 1987, **165**(3):683-692.
85. Matsumoto M, Park J, Yamada T: **Gastrin receptor characterization: affinity cross-linking of the gastrin receptor on canine gastric parietal cells.** *Am J Physiol* 1987, **252**(1 Pt 1):G143-147.
86. Ovchinnikov Yu A, Abdulaev NG, Bogachuk AS: **Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitylated.** *FEBS Lett* 1988, **230**(1-2):1-5.
87. Yassin RR, Abrams JT: **Gastrin induces IP₃ formation through phospholipase C gamma 1 and pp60c-src kinase.** *Peptides* 1998, **19**(1):47-55.
88. Rozengurt E, Walsh JH: **Gastrin, CCK, signaling, and cancer.** *Annu Rev Physiol* 2001, **63**:49-76.
89. Dabrowski A, Detjen KM, Logsdon CD, Williams JA: **Stimulation of both CCK-A and CCK-B receptors activates MAP kinases in AR42J and receptor-transfected CHO cells.** *Digestion* 1997, **58**(4):361-367.
90. Daulhac L, Kowalski-Chauvel A, Pradayrol L, Vaysse N, Seva C: **Src-family tyrosine kinases in activation of ERK-1 and p85/p110-phosphatidylinositol 3-kinase by G/CCKB receptors.** *J Biol Chem* 1999, **274**(29):20657-20663.

91. Guo YS, Cheng JZ, Jin GF, Gutkind JS, Hellmich MR, Townsend CM, Jr.: **Gastrin stimulates cyclooxygenase-2 expression in intestinal epithelial cells through multiple signaling pathways. Evidence for involvement of ERK5 kinase and transactivation of the epidermal growth factor receptor.** *J Biol Chem* 2002, **277**(50):48755-48763.
92. Sinclair NF, Ai W, Raychowdhury R, Bi M, Wang TC, Koh TJ, McLaughlin JT: **Gastrin regulates the heparin-binding epidermal-like growth factor promoter via a PKC/EGFR-dependent mechanism.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004, **286**(6):G992-999.
93. Dehez S, Daulhac L, Kowalski-Chauvel A, Fourmy D, Pradayrol L, Seva C: **Gastrin-induced DNA synthesis requires p38-MAPK activation via PKC/Ca(2+) and Src-dependent mechanisms.** *FEBS Lett* 2001, **496**(1):25-30.
94. Bierkamp C, Kowalski-Chauvel A, Dehez S, Fourmy D, Pradayrol L, Seva C: **Gastrin mediated cholecystokinin-2 receptor activation induces loss of cell adhesion and scattering in epithelial MDCK cells.** *Oncogene* 2002, **21**(50):7656-7670.
95. Harris JC, Clarke PA, Awan A, Jankowski J, Watson SA: **An antiapoptotic role for gastrin and the gastrin/CCK-2 receptor in Barrett's esophagus.** *Cancer Res* 2004, **64**(6):1915-1919.
96. Ferrand A, Kowalski-Chauvel A, Bertrand C, Escrieut C, Mathieu A, Portolan G, Pradayrol L, Fourmy D, Dufresne M, Seva C: **A novel mechanism for JAK2 activation by a G protein-coupled receptor, the CCK2R: implication of this signaling pathway in pancreatic tumor models.** *J Biol Chem* 2005, **280**(11):10710-10715.
97. Gales C, Kowalski-Chauvel A, Dufour MN, Seva C, Moroder L, Pradayrol L, Vaysse N, Fourmy D, Silvente-Poirot S: **Mutation of Asn-391 within the conserved NPXXY motif of the cholecystokinin B receptor abolishes Gq protein activation without affecting its association with the receptor.** *J Biol Chem* 2000, **275**(23):17321-17327.
98. Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Holt JA, Ferguson SS, Caron MG, Barak LS: **The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(7):3712-3717.
99. Pohl M, Silvente-Poirot S, Pisegna JR, Tarasova NI, Wank SA: **Ligand-induced internalization of cholecystokinin receptors. Demonstration of the importance of the carboxyl terminus for ligand-induced internalization of the rat cholecystokinin type B receptor but not the type A receptor.** *J Biol Chem* 1997, **272**(29):18179-18184.
100. Magnan R, Masri B, Escrieut C, Foucaud M, Cordelier P, Fourmy D: **Regulation of membrane cholecystokinin-2 receptor by agonists enables classification of partial agonists as biased agonists.** *J Biol Chem* 2010, **286**(8):6707-6719.
101. Moore CA, Milano SK, Benovic JL: **Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins.** *Annu Rev Physiol* 2007, **69**:451-482.
102. Anborgh PH, Seachrist JL, Dale LB, Ferguson SS: **Receptor/beta-arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of beta2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors.** *Mol Endocrinol* 2000, **14**(12):2040-2053.
103. Stenmark H: **Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, **10**(8):513-525.
104. Seachrist JL, Ferguson SS: **Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases.** *Life Sci* 2003, **74**(2-3):225-235.

105. Cheng ZJ, Harikumar KG, Holicky EL, Miller LJ: **Heterodimerization of type A and B cholecystokinin receptors enhance signaling and promote cell growth.** *J Biol Chem* 2003, **278**(52):52972-52979.
106. Mantyh CR, Pappas TN, Vigna SR: **Localization of cholecystokinin A and cholecystokinin B/gastrin receptors in the canine upper gastrointestinal tract.** *Gastroenterology* 1994, **107**(4):1019-1030.
107. Reubi JC, Waser B, Laderach U, Stettler C, Friess H, Halter F, Schmassmann A: **Localization of cholecystokinin A and cholecystokinin B-gastrin receptors in the human stomach.** *Gastroenterology* 1997, **112**(4):1197-1205.
108. Ding XQ, Lindstrom E, Hakanson R: **Evaluation of three novel cholecystokinin-B/gastrin receptor antagonists: a study of their effects on rat stomach enterochromaffin-like cell activity.** *Pharmacol Toxicol* 1997, **81**(5):232-237.
109. Tarasova NI, Romanov VI, Da Silva PP, Michejda CJ: **Numerous cell targets for gastrin in the guinea pig stomach revealed by gastrin/CCKB receptor localization.** *Cell Tissue Res* 1996, **283**(1):1-6.
110. Ji B, Bi Y, Simeone D, Mortensen RM, Logsdon CD: **Human pancreatic acinar cells lack functional responses to cholecystokinin and gastrin.** *Gastroenterology* 2001, **121**(6):1380-1390.
111. Murphy JA, Criddle DN, Sherwood M, Chvanov M, Mukherjee R, McLaughlin E, Booth D, Gerasimenko JV, Raraty MG, Ghaneh P *et al*: **Direct activation of cytosolic Ca²⁺ signaling and enzyme secretion by cholecystokinin in human pancreatic acinar cells.** *Gastroenterology* 2008, **135**(2):632-641.
112. Morisset J, Julien S, Laine J: **Localization of cholecystokinin receptor subtypes in the endocrine pancreas.** *J Histochem Cytochem* 2003, **51**(11):1501-1513.
113. Lay JM, Jenkins C, Friis-Hansen L, Samuelson LC: **Structure and developmental expression of the mouse CCK-B receptor gene.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **272**(3):837-842.
114. Mazzocchi G, Malendowicz LK, Aragona F, Spinazzi R, Nussdorfer GG: **Cholecystokinin (CCK) stimulates aldosterone secretion from human adrenocortical cells via CCK2 receptors coupled to the adenylate cyclase/protein kinase A signaling cascade.** *J Clin Endocrinol Metab* 2004, **89**(3):1277-1284.
115. von Schrenck T, Ahrens M, de Weerth A, Bobrowski C, Wolf G, Jonas L, Jocks T, Schulz M, Blaker M, Neumaier M *et al*: **CCKB/gastrin receptors mediate changes in sodium and potassium absorption in the isolated perfused rat kidney.** *Kidney Int* 2000, **58**(3):995-1003.
116. Dietl MM, Probst A, Palacios JM: **On the distribution of cholecystokinin receptor binding sites in the human brain: an autoradiographic study.** *Synapse* 1987, **1**(2):169-183.
117. Langmesser S, Cerezo-Guisado MI, Lorenzo MJ, Garcia-Marin LJ, Bragado MJ: **CCK1 and 2 receptors are expressed in immortalized rat brain neuroblasts: intracellular signals after cholecystokinin stimulation.** *J Cell Biochem* 2007, **100**(4):851-864.
118. Massoubre C, Rattner A, Pellet J, Frey J, Chamson A: **La cholécystokinine: mise au point.** *Nutrition Clinique et Métabolisme* 2002, **16**(1):4-13.
119. Clerc P, Coll Constans MG, Lulka H, Broussaud S, Guigne C, Leung-Theung-Long S, Perrin C, Knauf C, Carpenne C, Penicaud L *et al*: **Involvement of cholecystokinin 2 receptor in food intake regulation: hyperphagia and increased fat deposition in cholecystokinin 2 receptor-deficient mice.** *Endocrinology* 2007, **148**(3):1039-1049.

120. Friis-Hansen L, Sundler F, Li Y, Gillespie PJ, Saunders TL, Greenson JK, Owyang C, Rehfeld JF, Samuelson LC: **Impaired gastric acid secretion in gastrin-deficient mice.** *Am J Physiol* 1998, **274**(3 Pt 1):G561-568.
121. Kirton CM, Wang T, Dockray GJ: **Regulation of parietal cell migration by gastrin in the mouse.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002, **283**(3):G787-793.
122. Marshall BJ, Windsor HM: **The relation of Helicobacter pylori to gastric adenocarcinoma and lymphoma: pathophysiology, epidemiology, screening, clinical presentation, treatment, and prevention.** *Med Clin North Am* 2005, **89**(2):313-344, viii.
123. Gough DB, Thompson GB, Crotty TB, Donohue JH, Kvols LK, Carney JA, Grant CS, Nagorney DM: **Diverse clinical and pathologic features of gastric carcinoid and the relevance of hypergastrinemia.** *World J Surg* 1994, **18**(4):473-479; discussion 479-480.
124. Hur K, Kwak MK, Lee HJ, Park DJ, Lee HK, Lee HS, Kim WH, Michaeli D, Yang HK: **Expression of gastrin and its receptor in human gastric cancer tissues.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2006, **132**(2):85-91.
125. Clerc P, Leung-Theung-Long S, Wang TC, Dockray GJ, Bouisson M, Delisle MB, Vaysse N, Pradayrol L, Fourmy D, Dufresne M: **Expression of CCK2 receptors in the murine pancreas: proliferation, transdifferentiation of acinar cells, and neoplasia.** *Gastroenterology* 2002, **122**(2):428-437.
126. Clerc P, Saillan-Barreau C, Desbois C, Pradayrol L, Fourmy D, Dufresne M: **Transgenic mice expressing cholecystokinin 2 receptors in the pancreas.** *Pharmacol Toxicol* 2002, **91**(6):321-326.
127. Caplin M, Savage K, Khan K, Brett B, Rode J, Varro A, Dhillon A: **Expression and processing of gastrin in pancreatic adenocarcinoma.** *Br J Surg* 2000, **87**(8):1035-1040.
128. Smith AM, Watson SA: **Review article: gastrin and colorectal cancer.** *Aliment Pharmacol Ther* 2000, **14**(10):1231-1247.
129. Koh TJ, Dockray GJ, Varro A, Cahill RJ, Dangler CA, Fox JG, Wang TC: **Overexpression of glycine-extended gastrin in transgenic mice results in increased colonic proliferation.** *J Clin Invest* 1999, **103**(8):1119-1126.
130. Stepan VM, Sawada M, Todisco A, Dickinson CJ: **Glycine-extended gastrin exerts growth-promoting effects on human colon cancer cells.** *Mol Med* 1999, **5**(3):147-159.
131. Wang TC, Koh TJ, Varro A, Cahill RJ, Dangler CA, Fox JG, Dockray GJ: **Processing and proliferative effects of human progastrin in transgenic mice.** *J Clin Invest* 1996, **98**(8):1918-1929.
132. Jin G, Ramanathan V, Quante M, Baik GH, Yang X, Wang SS, Tu S, Gordon SA, Pritchard DM, Varro A *et al*: **Inactivating cholecystokinin-2 receptor inhibits progastrin-dependent colonic crypt fission, proliferation, and colorectal cancer in mice.** *J Clin Invest* 2009, **119**(9):2691-2701.
133. Cobb S, Wood T, Tessarollo L, Velasco M, Given R, Varro A, Tarasova N, Singh P: **Deletion of functional gastrin gene markedly increases colon carcinogenesis in response to azoxymethane in mice.** *Gastroenterology* 2002, **123**(2):516-530.
134. Colucci R, Blandizzi C, Tanini M, Vassalle C, Breschi MC, Del Tacca M: **Gastrin promotes human colon cancer cell growth via CCK-2 receptor-mediated cyclooxygenase-2 induction and prostaglandin E2 production.** *Br J Pharmacol* 2005, **144**(3):338-348.

135. Koh TJ, Goldenring JR, Ito S, Mashimo H, Kopin AS, Varro A, Dockray GJ, Wang TC: **Gastrin deficiency results in altered gastric differentiation and decreased colonic proliferation in mice.** *Gastroenterology* 1997, **113**(3):1015-1025.
136. Yu HG, Tong SL, Ding YM, Ding J, Fang XM, Zhang XF, Liu ZJ, Zhou YH, Liu QS, Luo HS *et al*: **Enhanced expression of cholecystokinin-2 receptor promotes the progression of colon cancer through activation of focal adhesion kinase.** *Int J Cancer* 2006, **119**(12):2724-2732.
137. Muerkoster S, Isberner A, Arlt A, Witt M, Reimann B, Blaszczyk E, Werbing V, Folsch UR, Schmitz F, Schafer H: **Gastrin suppresses growth of CCK2 receptor expressing colon cancer cells by inducing apoptosis in vitro and in vivo.** *Gastroenterology* 2005, **129**(3):952-968.
138. Schmitz F, Otte JM, Stechele HU, Reimann B, Banasiewicz T, Folsch UR, Schmidt WE, Herzig KH: **CCK-B/gastrin receptors in human colorectal cancer.** *Eur J Clin Invest* 2001, **31**(9):812-820.
139. Imdahl A, Mantamadiotis T, Eggstein S, Farthmann EH, Baldwin GS: **Expression of gastrin, gastrin/CCK-B and gastrin/CCK-C receptors in human colorectal carcinomas.** *J Cancer Res Clin Oncol* 1995, **121**(11):661-666.
140. Miyake A: **A truncated isoform of human CCK-B/gastrin receptor generated by alternative usage of a novel exon.** *Biochem Biophys Res Commun* 1995, **208**(1):230-237.
141. Hellmich MR, Rui XL, Hellmich HL, Fleming RY, Evers BM, Townsend CM, Jr.: **Human colorectal cancers express a constitutively active cholecystokinin-B/gastrin receptor that stimulates cell growth.** *J Biol Chem* 2000, **275**(41):32122-32128.
142. Smith JP, Verderame MF, McLaughlin P, Martenis M, Ballard E, Zagon IS: **Characterization of the CCK-C (cancer) receptor in human pancreatic cancer.** *Int J Mol Med* 2002, **10**(6):689-694.
143. Schmitz F, Schrader H, Otte J, Schmitz H, Stuber E, Herzig K, Schmidt WE: **Identification of CCK-B/gastrin receptor splice variants in human peripheral blood mononuclear cells.** *Regul Pept* 2001, **101**(1-3):25-33.
144. Ding WQ, Kuntz SM, Miller LJ: **A misspliced form of the cholecystokinin-B/gastrin receptor in pancreatic carcinoma: role of reduced sellular U2AF35 and a suboptimal 3'-splicing site leading to retention of the fourth intron.** *Cancer Res* 2002, **62**(3):947-952.
145. Cheng ZJ, Harikumar KG, Ding WQ, Holicky EL, Miller LJ: **Analysis of the cellular and molecular mechanisms of trophic action of a misspliced form of the type B cholecystokinin receptor present in colon and pancreatic cancer.** *Cancer Lett* 2005, **222**(1):95-105.
146. Korner M, Waser B, Reubi JC, Miller LJ: **CCK(2) receptor splice variant with intron 4 retention in human gastrointestinal and lung tumours.** *J Cell Mol Med* 2009, **14**(4):933-943.
147. Yu HG, Schafer H, Mergler S, Muerkoster S, Cramer T, Hocker M, Herzig KH, Schmidt WE, Schmitz F: **Valine-286 residue in the third intracellular loop of the cholecystokinin 2 receptor exerts a pivotal role in cholecystokinin 2 receptor mediated intracellular signal transduction in human colon cancer cells.** *Cell Signal* 2005, **17**(12):1505-1515.
148. Matsumori Y, Katakami N, Ito M, Taniguchi T, Iwata N, Takaishi T, Chihara K, Matsui T: **Cholecystokinin-B/gastrin receptor: a novel molecular probe for human small cell lung cancer.** *Cancer Res* 1995, **55**(2):276-279.

149. Sethi T, Herget T, Wu SV, Walsh JH, Rozengurt E: **CCKA and CCKB receptors are expressed in small cell lung cancer lines and mediate Ca²⁺ mobilization and clonal growth.** *Cancer Res* 1993, **53**(21):5208-5213.
150. Reubi JC, Waser B: **Unexpected high incidence of cholecystokinin-B/gastrin receptors in human medullary thyroid carcinomas.** *Int J Cancer* 1996, **67**(5):644-647.
151. Schaer JC, Reubi JC: **High gastrin and cholecystokinin (CCK) gene expression in human neuronal, renal, and myogenic stem cell tumors: comparison with CCK-A and CCK-B receptor contents.** *J Clin Endocrinol Metab* 1999, **84**(1):233-239.
152. Kwekkeboom DJ, Bakker WH, Kooij PP, Erion J, Srinivasan A, de Jong M, Reubi JC, Krenning EP: **Cholecystokinin receptor imaging using an octapeptide DTPA-CCK analogue in patients with medullary thyroid carcinoma.** *Eur J Nucl Med* 2000, **27**(9):1312-1317.
153. Behr TM, Jenner N, Behe M, Angerstein C, Gratz S, Raue F, Becker W: **Radiolabeled peptides for targeting cholecystokinin-B/gastrin receptor-expressing tumors.** *J Nucl Med* 1999, **40**(6):1029-1044.
154. Froberg AC, de Jong M, Nock BA, Breeman WA, Erion JL, Maina T, Verdijsseeldonck M, de Herder WW, van der Lugt A, Kooij PP *et al*: **Comparison of three radiolabelled peptide analogues for CCK-2 receptor scintigraphy in medullary thyroid carcinoma.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2009, **36**(8):1265-1272.
155. Behe M, Kluge G, Becker W, Gotthardt M, Behr TM: **Use of polyglutamic acids to reduce uptake of radiometal-labeled minigastrin in the kidneys.** *J Nucl Med* 2005, **46**(6):1012-1015.
156. Mather SJ, McKenzie AJ, Sosabowski JK, Morris TM, Ellison D, Watson SA: **Selection of radiolabeled gastrin analogs for peptide receptor-targeted radionuclide therapy.** *J Nucl Med* 2007, **48**(4):615-622.
157. von Guggenberg E, Rangger C, Sosabowski J, Laverman P, Reubi JC, Virgolini IJ, Decristoforo C: **Preclinical Evaluation of Radiolabeled DOTA-Derivatized Cyclic Minigastrin Analogs for Targeting Cholecystokinin Receptor Expressing Malignancies.** *Mol Imaging Biol* 2011.
158. Kolenc-Peitl P, Mansi R, Tamma M, Gmeiner-Stopar T, Sollner-Dolenc M, Waser B, Baum RP, Reubi JC, Maecke HR: **Highly improved metabolic stability and pharmacokinetics of indium-111-DOTA-gastrin conjugates for targeting of the gastrin receptor.** *J Med Chem* 2011, **54**(8):2602-2609.
159. Roosenburg S, Laverman P, van Delft FL, Boerman OC: **Radiolabeled CCK/gastrin peptides for imaging and therapy of CCK2 receptor-expressing tumors.** *Amino Acids* 2010, **41**(5):1049-1058.
160. Sanvicens N, Marco MP: **Multifunctional nanoparticles--properties and prospects for their use in human medicine.** *Trends Biotechnol* 2008, **26**(8):425-433.
161. O'Shaughnessy JA: **Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer.** *Clin Breast Cancer* 2003, **4**(5):318-328.
162. Schmidinger M, Wenzel C, Locker GJ, Muehlbacher F, Steininger R, Gnant M, Crevenna R, Budinsky AC: **Pilot study with pegylated liposomal doxorubicin for advanced or unresectable hepatocellular carcinoma.** *Br J Cancer* 2001, **85**(12):1850-1852.
163. Sapra P, Allen TM: **Ligand-targeted liposomal anticancer drugs.** *Prog Lipid Res* 2003, **42**(5):439-462.
164. Torchilin VP: **Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers.** *Nat Rev Drug Discov* 2005, **4**(2):145-160.

165. Iwanaga K, Ono S, Narioka K, Kakemi M, Morimoto K, Yamashita S, Namba Y, Oku N: **Application of surface-coated liposomes for oral delivery of peptide: effects of coating the liposome's surface on the GI transit of insulin.** *J Pharm Sci* 1999, **88**(2):248-252.
166. Opanasopit P, Sakai M, Nishikawa M, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M: **Inhibition of liver metastasis by targeting of immunomodulators using mannosylated liposome carriers.** *J Control Release* 2002, **80**(1-3):283-294.
167. Othman M, Desmaele D, Couvreur P, Vander Elst L, Laurent S, Muller RN, Bourgaux C, Morvan E, Pouget T, Lepetre-Mouelhi S *et al*: **Synthesis and physicochemical characterization of new squalenoyl amphiphilic gadolinium complexes as nanoparticle contrast agents.** *Org Biomol Chem* 2011, **9**(11):4367-4386.
168. Gindy ME, Prud'homme RK: **Multifunctional nanoparticles for imaging, delivery and targeting in cancer therapy.** *Expert Opin Drug Deliv* 2009, **6**(8):865-878.
169. Sanson C, Schatz C, Le Meins JF, Soum A, Thevenot J, Garanger E, Lecommandoux S: **A simple method to achieve high doxorubicin loading in biodegradable polymersomes.** *J Control Release* 2010, **147**(3):428-435.
170. Upadhyay KK, Mishra AK, Chuttani K, Kaul A, Schatz C, Le Meins JF, Misra A, Lecommandoux S: **The in vivo behavior and antitumor activity of doxorubicin-loaded poly(gamma-benzyl l-glutamate)-block-hyaluronan polymersomes in Ehrlich ascites tumor-bearing BalB/c mice.** *Nanomedicine* 2011, **8**(1):71-80.
171. Kim DW, Kim SY, Kim HK, Kim SW, Shin SW, Kim JS, Park K, Lee MY, Heo DS: **Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a novel Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, with cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer.** *Ann Oncol* 2007, **18**(12):2009-2014.
172. Lee CC, MacKay JA, Frechet JM, Szoka FC: **Designing dendrimers for biological applications.** *Nat Biotechnol* 2005, **23**(12):1517-1526.
173. Wijagkanalan W, Kawakami S, Hashida M: **Designing dendrimers for drug delivery and imaging: pharmacokinetic considerations.** *Pharm Res* 2010, **28**(7):1500-1519.
174. Liu M, Kono K, Frechet JM: **Water-soluble dendritic unimolecular micelles: their potential as drug delivery agents.** *J Control Release* 2000, **65**(1-2):121-131.
175. Kojima C, Kono K, Maruyama K, Takagishi T: **Synthesis of polyamidoamine dendrimers having poly(ethylene glycol) grafts and their ability to encapsulate anticancer drugs.** *Bioconjug Chem* 2000, **11**(6):910-917.
176. Kobayashi H, Brechbiel MW: **Nano-sized MRI contrast agents with dendrimer cores.** *Adv Drug Deliv Rev* 2005, **57**(15):2271-2286.
177. Dufes C, Uchegbu IF, Schatzlein AG: **Dendrimers in gene delivery.** *Adv Drug Deliv Rev* 2005, **57**(15):2177-2202.
178. Bottini M, Rosato N, Bottini N: **PEG-modified carbon nanotubes in biomedicine: current status and challenges ahead.** *Biomacromolecules* 2011, **12**(10):3381-3393.
179. Hong H, Gao T, Cai W: **Molecular Imaging with Single-Walled Carbon Nanotubes.** *Nano Today* 2009, **4**(3):252-261.
180. Ji SR, Liu C, Zhang B, Yang F, Xu J, Long J, Jin C, Fu DL, Ni QX, Yu XJ: **Carbon nanotubes in cancer diagnosis and therapy.** *Biochim Biophys Acta* 2010, **1806**(1):29-35.
181. Liu Z, Chen K, Davis C, Sherlock S, Cao Q, Chen X, Dai H: **Drug delivery with carbon nanotubes for in vivo cancer treatment.** *Cancer Res* 2008, **68**(16):6652-6660.
182. Liu Z, Winters M, Holodniy M, Dai H: **siRNA delivery into human T cells and primary cells with carbon-nanotube transporters.** *Angew Chem Int Ed Engl* 2007, **46**(12):2023-2027.

183. de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Barentsz JO, Verdijk P, van Krieken JH, Boerman OC, Oyen WJ, Bonenkamp JJ, Boezeman JB, Adema GJ *et al*: **Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy.** *Nat Biotechnol* 2005, **23**(11):1407-1413.
184. Johnston HJ, Hutchison GR, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Aschberger K, Stone V: **A critical review of the biological mechanisms underlying the in vivo and in vitro toxicity of carbon nanotubes: The contribution of physico-chemical characteristics.** *Nanotoxicology* 2010, **4**(2):207-246.
185. Muller J, Decordier I, Hoet PH, Lombaert N, Thomassen L, Huaux F, Lison D, Kirsch-Volders M: **Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells.** *Carcinogenesis* 2008, **29**(2):427-433.
186. Medintz IL, Uyeda HT, Goldman ER, Mattoussi H: **Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing.** *Nat Mater* 2005, **4**(6):435-446.
187. Parak WJ, Pellegrino T, Plank C: **Labelling of cells with quantum dots.** *Nanotechnology* 2005, **16**(2):R9-R25.
188. Pelley JL, Daar AS, Saner MA: **State of academic knowledge on toxicity and biological fate of quantum dots.** *Toxicol Sci* 2009, **112**(2):276-296.
189. Cho SJ, Maysinger D, Jain M, Roder B, Hackbarth S, Winnik FM: **Long-term exposure to CdTe quantum dots causes functional impairments in live cells.** *Langmuir* 2007, **23**(4):1974-1980.
190. Ryman-Rasmussen JP, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA: **Surface coatings determine cytotoxicity and irritation potential of quantum dot nanoparticles in epidermal keratinocytes.** *J Invest Dermatol* 2007, **127**(1):143-153.
191. Zhang Y, Chen W, Zhang J, Liu J, Chen G, Pope C: **In vitro and in vivo toxicity of CdTe nanoparticles.** *J Nanosci Nanotechnol* 2007, **7**(2):497-503.
192. Tang M, Xing T, Zeng J, Wang H, Li C, Yin S, Yan D, Deng H, Liu J, Wang M *et al*: **Unmodified CdSe quantum dots induce elevation of cytoplasmic calcium levels and impairment of functional properties of sodium channels in rat primary cultured hippocampal neurons.** *Environ Health Perspect* 2008, **116**(7):915-922.
193. Chibli H, Carlini L, Park S, Dimitrijevic NM, Nadeau JL: **Cytotoxicity of InP/ZnS quantum dots related to reactive oxygen species generation.** *Nanoscale* 2011, **3**(6):2552-2559.
194. Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA: **Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy.** *Nanomedicine (Lond)* 2007, **2**(5):681-693.
195. Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD: **Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity.** *Small* 2005, **1**(3):325-327.
196. Pitsillides CM, Joe EK, Wei X, Anderson RR, Lin CP: **Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles.** *Biophys J* 2003, **84**(6):4023-4032.
197. El-Sayed IH, Huang X, El-Sayed MA: **Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles.** *Cancer Lett* 2006, **239**(1):129-135.
198. Hirsch LR, Stafford RJ, Bankson JA, Sershen SR, Rivera B, Price RE, Hazle JD, Halas NJ, West JL: **Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(23):13549-13554.

199. Morjani H, Riou JF, Nabiev I, Lavelle F, Manfait M: **Molecular and cellular interactions between intoplicine, DNA, and topoisomerase II studied by surface-enhanced Raman scattering spectroscopy.** *Cancer Res* 1993, **53**(20):4784-4790.
200. Bulte JW, Kraitchman DL: **Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging.** *NMR Biomed* 2004, **17**(7):484-499.
201. Sosnovik DE, Nahrendorf M, Weissleder R: **Magnetic nanoparticles for MR imaging: agents, techniques and cardiovascular applications.** *Basic Res Cardiol* 2008, **103**(2):122-130.
202. Grobner T: **Gadolinium--a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis?** *Nephrol Dial Transplant* 2006, **21**(4):1104-1108.
203. Marckmann P, Skov L, Rossen K, Dupont A, Damholt MB, Heaf JG, Thomsen HS: **Nephrogenic systemic fibrosis: suspected causative role of gadodiamide used for contrast-enhanced magnetic resonance imaging.** *J Am Soc Nephrol* 2006, **17**(9):2359-2362.
204. Corchero JL, Villaverde A: **Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles.** *Trends Biotechnol* 2009, **27**(8):468-476.
205. Duguet E, Vasseur S, Mornet S, Devoisselle JM: **Magnetic nanoparticles and their applications in medicine.** *Nanomedicine (Lond)* 2006, **1**(2):157-168.
206. Corot C, Robert P, Idee JM, Port M: **Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging.** *Adv Drug Deliv Rev* 2006, **58**(14):1471-1504.
207. Veiseh O, Gunn JW, Zhang M: **Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging.** *Adv Drug Deliv Rev* 2009, **62**(3):284-304.
208. Arsianti M, Lim M, Marquis CP, Amal R: **Assembly of polyethylenimine-based magnetic iron oxide vectors: insights into gene delivery.** *Langmuir* 2010, **26**(10):7314-7326.
209. Kami D, Takeda S, Itakura Y, Gojo S, Watanabe M, Toyoda M: **Application of magnetic nanoparticles to gene delivery.** *Int J Mol Sci* 2011, **12**(6):3705-3722.
210. Kim JE, Shin JY, Cho MH: **Magnetic nanoparticles: an update of application for drug delivery and possible toxic effects.** *Arch Toxicol* 2011.
211. Bulte JW, Arbab AS, Douglas T, Frank JA: **Preparation of magnetically labeled cells for cell tracking by magnetic resonance imaging.** *Methods Enzymol* 2004, **386**:275-299.
212. Bulte JW, Ma LD, Magin RL, Kamman RL, Hulstaert CE, Go KG, The TH, de Leij L: **Selective MR imaging of labeled human peripheral blood mononuclear cells by liposome mediated incorporation of dextran-magnetite particles.** *Magn Reson Med* 1993, **29**(1):32-37.
213. Chang Y, Meng X, Zhao Y, Li K, Zhao B, Zhu M, Li Y, Chen X, Wang J: **Novel water-soluble and pH-responsive anticancer drug nanocarriers: doxorubicin-PAMAM dendrimer conjugates attached to superparamagnetic iron oxide nanoparticles (IONPs).** *J Colloid Interface Sci* 2011, **363**(1):403-409.
214. Zhang ZY, Smith BD: **High-generation polycationic dendrimers are unusually effective at disrupting anionic vesicles: membrane bending model.** *Bioconjug Chem* 2000, **11**(6):805-814.
215. Huber DL: **Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles.** *Small* 2005, **1**(5):482-501.
216. Yigit MV, Moore A, Medarova Z: **Magnetic Nanoparticles for Cancer Diagnosis and Therapy.** *Pharm Res* 2012.

217. Weissleder R, Stark DD, Engelstad BL, Bacon BR, Compton CC, White DL, Jacobs P, Lewis J: **Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity.** *AJR Am J Roentgenol* 1989, **152**(1):167-173.
218. Jung CW, Jacobs P: **Physical and chemical properties of superparamagnetic iron oxide MR contrast agents: ferumoxides, ferumoxtran, ferumoxsil.** *Magn Reson Imaging* 1995, **13**(5):661-674.
219. Semelka RC, Helmberger TK: **Contrast agents for MR imaging of the liver.** *Radiology* 2001, **218**(1):27-38.
220. Wang YX, Hussain SM, Krestin GP: **Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging.** *Eur Radiol* 2001, **11**(11):2319-2331.
221. Yu B, Tai HC, Xue W, Lee LJ, Lee RJ: **Receptor-targeted nanocarriers for therapeutic delivery to cancer.** *Mol Membr Biol* 2010, **27**(7):286-298.
222. Shapira A, Livney YD, Broxterman HJ, Assaraf YG: **Nanomedicine for targeted cancer therapy: towards the overcoming of drug resistance.** *Drug Resist Updat* 2011, **14**(3):150-163.
223. Alexiou C, Arnold W, Klein RJ, Parak FG, Hulin P, Bergemann C, Erhardt W, Wagenpfeil S, Lubbe AS: **Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting.** *Cancer Res* 2000, **60**(23):6641-6648.
224. Krukemeyer MG, Krenn V, Jakobs M, Wagner W: **Mitoxantrone-Iron Oxide Biodistribution in Blood, Tumor, Spleen, and Liver-Magnetic Nanoparticles in Cancer Treatment.** *J Surg Res* 2011.
225. Fiallo MM, Garnier-Suillerot A, Matzanke B, Kozlowski H: **How Fe³⁺ binds anthracycline antitumour compounds. The myth and the reality of a chemical sphinx.** *J Inorg Biochem* 1999, **75**(2):105-115.
226. Munier E, Cohen-Jonathan S, Linassier C, Douziech-Eyrolles L, Marchais H, Souce M, Herve K, Dubois P, Chourpa I: **Novel method of doxorubicin-SPION reversible association for magnetic drug targeting.** *Int J Pharm* 2008, **363**(1-2):170-176.
227. Yu MK, Jeong YY, Park J, Park S, Kim JW, Min JJ, Kim K, Jon S: **Drug-loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined cancer imaging and therapy in vivo.** *Angew Chem Int Ed Engl* 2008, **47**(29):5362-5365.
228. Yang X, Hong H, Grailer JJ, Rowland IJ, Javadi A, Hurley SA, Xiao Y, Yang Y, Zhang Y, Nickles RJ *et al*: **cRGD-functionalized, DOX-conjugated, and Cu-labeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeted anticancer drug delivery and PET/MR imaging.** *Biomaterials* 2011, **32**(17):4151-4160.
229. Kievit FM, Wang FY, Fang C, Mok H, Wang K, Silber JR, Ellenbogen RG, Zhang M: **Doxorubicin loaded iron oxide nanoparticles overcome multidrug resistance in cancer in vitro.** *J Control Release* 2011, **152**(1):76-83.
230. Kohler N, Sun C, Fichtenholtz A, Gunn J, Fang C, Zhang M: **Methotrexate-immobilized poly(ethylene glycol) magnetic nanoparticles for MR imaging and drug delivery.** *Small* 2006, **2**(6):785-792.
231. Duncan R: **Development of HPMA copolymer-anticancer conjugates: clinical experience and lessons learnt.** *Adv Drug Deliv Rev* 2009, **61**(13):1131-1148.
232. Palyi I, Vincze B, Lovas S, Mezo I, Pato J, Kalnay A, Turi G, Gaal D, Mihalik R, Peter I *et al*: **Gonadotropin-releasing hormone analogue conjugates with strong selective antitumor activity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(5):2361-2366.
233. Zamai M, VandeVen M, Farao M, Gratton E, Ghiglieri A, Castelli MG, Fontana E, D'Argy R, Fiorino A, Pesenti E *et al*: **Camptothecin poly[n-(2-hydroxypropyl) methacrylamide] copolymers in antitopoisomerase-I tumor therapy: intratumor release and antitumor efficacy.** *Mol Cancer Ther* 2003, **2**(1):29-40.

234. Pechar M, Ulbrich K, Subr V, Seymour LW, Schacht EH: **Poly(ethylene glycol) multiblock copolymer as a carrier of anti-cancer drug doxorubicin.** *Bioconjug Chem* 2000, **11**(2):131-139.
235. Hopewell JW, Duncan R, Wilding D, Chakrabarti K: **Preclinical evaluation of the cardiotoxicity of PK2: a novel HPMA copolymer-doxorubicin-galactosamine conjugate antitumour agent.** *Hum Exp Toxicol* 2001, **20**(9):461-470.
236. Hanessian S, Grzyb JA, Cengelli F, Juillerat-Jeanneret L: **Synthesis of chemically functionalized superparamagnetic nanoparticles as delivery vectors for chemotherapeutic drugs.** *Bioorg Med Chem* 2008, **16**(6):2921-2931.
237. Cengelli F, Grzyb JA, Montoro A, Hofmann H, Hanessian S, Juillerat-Jeanneret L: **Surface-functionalized ultrasmall superparamagnetic nanoparticles as magnetic delivery vectors for camptothecin.** *ChemMedChem* 2009, **4**(6):988-997.
238. Ambrogio MW, Thomas CR, Zhao YL, Zink JI, Stoddart JF: **Mechanized silica nanoparticles: a new frontier in theranostic nanomedicine.** *Acc Chem Res* 2011, **44**(10):903-913.
239. Yang J, Lee H, Hyung W, Park SB, Haam S: **Magnetic PECA nanoparticles as drug carriers for targeted delivery: synthesis and release characteristics.** *J Microencapsul* 2006, **23**(2):203-212.
240. Edelman ER, Kost J, Bobeck H, Langer R: **Regulation of drug release from polymer matrices by oscillating magnetic fields.** *J Biomed Mater Res* 1985, **19**(1):67-83.
241. Nielsen OS, Horsman M, Overgaard J: **A future for hyperthermia in cancer treatment?** *Eur J Cancer* 2001, **37**(13):1587-1589.
242. Cherukuri P, Glazer ES, Curley SA: **Targeted hyperthermia using metal nanoparticles.** *Adv Drug Deliv Rev* 2009, **62**(3):339-345.
243. Kumar CS, Mohammad F: **Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery.** *Adv Drug Deliv Rev* 2011, **63**(9):789-808.
244. Gilchrist RK, Medal R, Shorey WD, Hanselman RC, Parrott JC, Taylor CB: **Selective inductive heating of lymph nodes.** *Ann Surg* 1957, **146**(4):596-606.
245. Babincov M, Altanerov V, Altaner C, Bergemann C, Babinec P: **In vitro analysis of cisplatin functionalized magnetic nanoparticles in combined cancer chemotherapy and electromagnetic hyperthermia.** *IEEE Trans Nanobioscience* 2008, **7**(1):15-19.
246. Hsu MH, Su YC: **Iron-oxide embedded solid lipid nanoparticles for magnetically controlled heating and drug delivery.** *Biomed Microdevices* 2008, **10**(6):785-793.
247. Campbell RB: **Battling tumors with magnetic nanotherapeutics and hyperthermia: turning up the heat.** *Nanomedicine (Lond)* 2007, **2**(5):649-652.
248. Kikumori T, Kobayashi T, Sawaki M, Imai T: **Anti-cancer effect of hyperthermia on breast cancer by magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes.** *Breast Cancer Res Treat* 2009, **113**(3):435-441.
249. Johannsen M, Gneveckow U, Eckelt L, Feussner A, Waldofner N, Scholz R, Deger S, Wust P, Loening SA, Jordan A: **Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: presentation of a new interstitial technique.** *Int J Hyperthermia* 2005, **21**(7):637-647.
250. Johannsen M, Gneveckow U, Thiesen B, Taymoorian K, Cho CH, Waldofner N, Scholz R, Jordan A, Loening SA, Wust P: **Thermotherapy of prostate cancer using magnetic nanoparticles: feasibility, imaging, and three-dimensional temperature distribution.** *Eur Urol* 2007, **52**(6):1653-1661.
251. Maier-Hauff K, Rothe R, Scholz R, Gneveckow U, Wust P, Thiesen B, Feussner A, von Deimling A, Waldofner N, Felix R *et al*: **Intracranial thermotherapy using**

- magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme.** *J Neurooncol* 2007, **81**(1):53-60.
252. Thiesen B, Jordan A: **Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia.** *Int J Hyperthermia* 2008, **24**(6):467-474.
253. Jain TK, Reddy MK, Morales MA, Leslie-Pelecky DL, Labhasetwar V: **Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats.** *Mol Pharm* 2008, **5**(2):316-327.
254. Almeida JP, Chen AL, Foster A, Drezek R: **In vivo biodistribution of nanoparticles.** *Nanomedicine (Lond)* 2011, **6**(5):815-835.
255. Dobrovolskaia MA, Aggarwal P, Hall JB, McNeil SE: **Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution.** *Mol Pharm* 2008, **5**(4):487-495.
256. Corot C, Petry KG, Trivedi R, Saleh A, Jonkmanns C, Le Bas JF, Blezer E, Rausch M, Brochet B, Foster-Gareau P *et al*: **Macrophage imaging in central nervous system and in carotid atherosclerotic plaque using ultrasmall superparamagnetic iron oxide in magnetic resonance imaging.** *Invest Radiol* 2004, **39**(10):619-625.
257. Raynal I, Prigent P, Peyramaure S, Najid A, Rebuzzi C, Corot C: **Macrophage endocytosis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: mechanisms and comparison of ferumoxides and ferumoxtran-10.** *Invest Radiol* 2004, **39**(1):56-63.
258. Schroeder A, Heller DA, Winslow MM, Dahlman JE, Pratt GW, Langer R, Jacks T, Anderson DG: **Treating metastatic cancer with nanotechnology.** *Nat Rev Cancer* 2011, **12**(1):39-50.
259. Kunzmann A, Andersson B, Vogt C, Feliu N, Ye F, Gabrielsson S, Toprak MS, Buerki-Thurnherr T, Laurent S, Vahter M *et al*: **Efficient internalization of silica-coated iron oxide nanoparticles of different sizes by primary human macrophages and dendritic cells.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2011, **253**(2):81-93.
260. Fleige G, Seeberger F, Laux D, Kresse M, Taupitz M, Pilgrimm H, Zimmer C: **In vitro characterization of two different ultrasmall iron oxide particles for magnetic resonance cell tracking.** *Invest Radiol* 2002, **37**(9):482-488.
261. Chouly C, Pouliquen D, Lucet I, Jeune JJ, Jallet P: **Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution.** *J Microencapsul* 1996, **13**(3):245-255.
262. Papisov MI, Bogdanov Jr A, Schaffer B, Nossiff N, Shen T, Weissleder R, Brady TJ: **Colloidal magnetic resonance contrast agents: effect of particle surface on biodistribution.** *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 1993, **122**(1-3):383-386.
263. Petri-Fink A, Chastellain M, Juillerat-Jeanneret L, Ferrari A, Hofmann H: **Development of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for interaction with human cancer cells.** *Biomaterials* 2005, **26**(15):2685-2694.
264. Cengelli F, Maysinger D, Tschudi-Monnet F, Montet X, Corot C, Petri-Fink A, Hofmann H, Juillerat-Jeanneret L: **Interaction of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles with brain structures.** *J Pharmacol Exp Ther* 2006, **318**(1):108-116.
265. Kenzaoui BH, Vila MR, Miquel JM, Cengelli F, Juillerat-Jeanneret L: **Evaluation of uptake and transport of cationic and anionic ultrasmall iron oxide nanoparticles by human colon cells.** *Int J Nanomedicine* 2012, **7**:1275-1286.
266. Wilhelm C, Billotey C, Roger J, Pons JN, Bacri JC, Gazeau F: **Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating.** *Biomaterials* 2003, **24**(6):1001-1011.

267. Verma A, Stellacci F: **Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions.** *Small* 2009, **6**(1):12-21.
268. Wilhelm C, Gazeau F: **Universal cell labelling with anionic magnetic nanoparticles.** *Biomaterials* 2008, **29**(22):3161-3174.
269. Osaka T, Nakanishi T, Shanmugam S, Takahama S, Zhang H: **Effect of surface charge of magnetite nanoparticles on their internalization into breast cancer and umbilical vein endothelial cells.** *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009, **71**(2):325-330.
270. Yu SS, Lau CM, Thomas SN, Jerome WG, Maron DJ, Dickerson JH, Hubbell JA, Giorgio TD: **Size- and charge-dependent non-specific uptake of PEGylated nanoparticles by macrophages.** *Int J Nanomedicine* 2012, **7**:799-813.
271. Choi HS, Liu W, Liu F, Nasr K, Misra P, Bawendi MG, Frangioni JV: **Design considerations for tumour-targeted nanoparticles.** *Nat Nanotechnol* 2009, **5**(1):42-47.
272. Bourrinet P, Bengel HH, Bonnemain B, Dencausse A, Idee JM, Jacobs PM, Lewis JM: **Preclinical safety and pharmacokinetic profile of ferumoxtran-10, an ultrasmall superparamagnetic iron oxide magnetic resonance contrast agent.** *Invest Radiol* 2006, **41**(3):313-324.
273. Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Ity Ipe B, Bawendi MG, Frangioni JV: **Renal clearance of quantum dots.** *Nat Biotechnol* 2007, **25**(10):1165-1170.
274. Chen Y, Chen BA: **[Application and advancement of magnetic iron-oxide nanoparticles in tumor-targeted therapy].** *Chin J Cancer* 2009, **29**(1):125-128.
275. Weissleder R, Heautot JF, Schaffer BK, Nossiff N, Papisov MI, Bogdanov A, Jr., Brady TJ: **MR lymphography: study of a high-efficiency lymphotropic agent.** *Radiology* 1994, **191**(1):225-230.
276. Sun C, Du K, Fang C, Bhattarai N, Veiseh O, Kievit F, Stephen Z, Lee D, Ellenbogen RG, Ratner B *et al*: **PEG-mediated synthesis of highly dispersive multifunctional superparamagnetic nanoparticles: their physicochemical properties and function in vivo.** *ACS Nano* 2010, **4**(4):2402-2410.
277. Larsen EK, Nielsen T, Wittenborn T, Rydtoft LM, Lokanathan AR, Hansen L, Ostergaard L, Kingshott P, Howard KA, Besenbacher F *et al*: **Accumulation of magnetic iron oxide nanoparticles coated with variably sized polyethylene glycol in murine tumors.** *Nanoscale* 2012.
278. Owens DE, 3rd, Peppas NA: **Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles.** *Int J Pharm* 2006, **307**(1):93-102.
279. Maeda H, Sawa T, Konno T: **Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS.** *J Control Release* 2001, **74**(1-3):47-61.
280. Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H: **Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting.** *Drug Discov Today* 2006, **11**(17-18):812-818.
281. Danhier F, Feron O, Preat V: **To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery.** *J Control Release* 2010, **148**(2):135-146.
282. Sudimack J, Lee RJ: **Targeted drug delivery via the folate receptor.** *Adv Drug Deliv Rev* 2000, **41**(2):147-162.
283. Warenus HM, Galfre G, Bleehen NM, Milstein C: **Attempted targeting of a monoclonal antibody in a human tumour xenograft system.** *Eur J Cancer Clin Oncol* 1981, **17**(9):1009-1015.
284. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendelsohn J: **Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel**

- and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts.** *Cancer Res* 1998, **58**(13):2825-2831.
285. Nielsen UB, Kirpotin DB, Pickering EM, Drummond DC, Marks JD: **A novel assay for monitoring internalization of nanocarrier coupled antibodies.** *BMC Immunol* 2006, **7**:24.
286. Daniels TR, Delgado T, Helguera G, Penichet ML: **The transferrin receptor part II: targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells.** *Clin Immunol* 2006, **121**(2):159-176.
287. Sahoo SK, Labhasetwar V: **Enhanced antiproliferative activity of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles is mediated via sustained intracellular drug retention.** *Mol Pharm* 2005, **2**(5):373-383.
288. Xu L, Pirollo KF, Tang WH, Rait A, Chang EH: **Transferrin-liposome-mediated systemic p53 gene therapy in combination with radiation results in regression of human head and neck cancer xenografts.** *Hum Gene Ther* 1999, **10**(18):2941-2952.
289. Russell-Jones GJ, Veitch H, Arthur L: **Lectin-mediated transport of nanoparticles across Caco-2 and OK cells.** *Int J Pharm* 1999, **190**(2):165-174.
290. Bhattacharyya S, Bhattacharya R, Curley S, McNiven MA, Mukherjee P: **Nanoconjugation modulates the trafficking and mechanism of antibody induced receptor endocytosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(33):14541-14546.
291. Zhao X, Li H, Lee RJ: **Targeted drug delivery via folate receptors.** *Expert Opin Drug Deliv* 2008, **5**(3):309-319.
292. Huwyler J, Wu D, Pardridge WM: **Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(24):14164-14169.
293. Zaki NM, Tirelli N: **Gateways for the intracellular access of nanocarriers: a review of receptor-mediated endocytosis mechanisms and of strategies in receptor targeting.** *Expert Opin Drug Deliv* 2010, **7**(8):895-913.
294. Eidne KA, Flanagan CA, Millar RP: **Gonadotropin-releasing hormone binding sites in human breast carcinoma.** *Science* 1985, **229**(4717):989-991.
295. Zhou J, Leuschner C, Kumar C, Hormes JF, Soboyejo WO: **Sub-cellular accumulation of magnetic nanoparticles in breast tumors and metastases.** *Biomaterials* 2006, **27**(9):2001-2008.
296. Leuschner C, Kumar CS, Hansel W, Soboyejo W, Zhou J, Hormes J: **LHRH-conjugated magnetic iron oxide nanoparticles for detection of breast cancer metastases.** *Breast Cancer Res Treat* 2006, **99**(2):163-176.
297. Tassa C, Shaw SY, Weissleder R: **Dextran-coated iron oxide nanoparticles: a versatile platform for targeted molecular imaging, molecular diagnostics, and therapy.** *Acc Chem Res* 2011, **44**(10):842-852.
298. McCarthy JR, Kelly KA, Sun EY, Weissleder R: **Targeted delivery of multifunctional magnetic nanoparticles.** *Nanomedicine (Lond)* 2007, **2**(2):153-167.
299. Surujpaul PP, Gutierrez-Wing C, Ocampo-Garcia B, Ramirez Fde M, Arteaga de Murphy C, Pedraza-Lopez M, Camacho-Lopez MA, Ferro-Flores G: **Gold nanoparticles conjugated to [Tyr3]octreotide peptide.** *Biophys Chem* 2008, **138**(3):83-90.
300. Li X, Du X, Huo T, Liu X, Zhang S, Yuan F: **Specific targeting of breast tumor by octreotide-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles using a clinical 3.0-Tesla magnetic resonance scanner.** *Acta Radiol* 2009, **50**(6):583-594.
301. Iwase Y, Maitani Y: **Octreotide-targeted liposomes loaded with CPT-11 enhanced cytotoxicity for the treatment of medullary thyroid carcinoma.** *Mol Pharm* 2010, **8**(2):330-337.

302. Chanda N, Kattumuri V, Shukla R, Zambre A, Katti K, Upendran A, Kulkarni RR, Kan P, Fent GM, Casteel SW *et al*: **Bombesin functionalized gold nanoparticles show in vitro and in vivo cancer receptor specificity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(19):8760-8765.
303. Montet X, Funovics M, Montet-Abou K, Weissleder R, Josephson L: **Multivalent effects of RGD peptides obtained by nanoparticle display.** *J Med Chem* 2006, **49**(20):6087-6093.
304. Hogemann-Savellano D, Bos E, Blondet C, Sato F, Abe T, Josephson L, Weissleder R, Gaudet J, Sgroi D, Peters PJ *et al*: **The transferrin receptor: a potential molecular imaging marker for human cancer.** *Neoplasia* 2003, **5**(6):495-506.
305. Zhang CY, Lu J, Tsourkas A: **Iron chelator-based amplification strategy for improved targeting of transferrin receptor with SPIO.** *Cancer Biol Ther* 2008, **7**(6):889-895.
306. Soenen SJ, Vercauteren D, Braeckmans K, Noppe W, De Smedt S, De Cuyper M: **Stable long-term intracellular labelling with fluorescently tagged cationic magnetoliposomes.** *Chembiochem* 2009, **10**(2):257-267.
307. Arsianti M, Lim M, Marquis CP, Amal R: **Polyethylenimine based magnetic iron-oxide vector: the effect of vector component assembly on cellular entry mechanism, intracellular localization, and cellular viability.** *Biomacromolecules* 2010, **11**(9):2521-2531.
308. Serda RE, Adolpho NL, Bisoffi M, Sillerud LO: **Targeting and cellular trafficking of magnetic nanoparticles for prostate cancer imaging.** *Mol Imaging* 2007, **6**(4):277-288.
309. Lu CW, Hung Y, Hsiao JK, Yao M, Chung TH, Lin YS, Wu SH, Hsu SC, Liu HM, Mou CY *et al*: **Bifunctional magnetic silica nanoparticles for highly efficient human stem cell labeling.** *Nano Lett* 2007, **7**(1):149-154.
310. Yang CY, Tai MF, Lin CP, Lu CW, Wang JL, Hsiao JK, Liu HM: **Mechanism of cellular uptake and impact of ferucarbotran on macrophage physiology.** *PLoS One* 2011, **6**(9):e25524.
311. Arbab AS, Wilson LB, Ashari P, Jordan EK, Lewis BK, Frank JA: **A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging.** *NMR Biomed* 2005, **18**(6):383-389.
312. Noh YW, Jang YS, Ahn KJ, Lim YT, Chung BH: **Simultaneous in vivo tracking of dendritic cells and priming of an antigen-specific immune response.** *Biomaterials* 2011, **32**(26):6254-6263.
313. Zou P, Yu Y, Wang YA, Zhong Y, Welton A, Galban C, Wang S, Sun D: **Superparamagnetic iron oxide nanotheranostics for targeted cancer cell imaging and pH-dependent intracellular drug release.** *Mol Pharm* 2010, **7**(6):1974-1984.
314. Schulze E, Ferrucci JT, Jr., Poss K, Lapointe L, Bogdanova A, Weissleder R: **Cellular uptake and trafficking of a prototypical magnetic iron oxide label in vitro.** *Invest Radiol* 1995, **30**(10):604-610.
315. Jain TK, Morales MA, Sahoo SK, Leslie-Pelecky DL, Labhasetwar V: **Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents.** *Mol Pharm* 2005, **2**(3):194-205.
316. Schroeder A, Levins CG, Cortez C, Langer R, Anderson DG: **Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery.** *J Intern Med* 2010, **267**(1):9-21.
317. Bareford LM, Swaan PW: **Endocytic mechanisms for targeted drug delivery.** *Adv Drug Deliv Rev* 2007, **59**(8):748-758.

318. Panyam J, Zhou WZ, Prabha S, Sahoo SK, Labhasetwar V: **Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery.** *FASEB J* 2002, **16**(10):1217-1226.
319. Kang B, Mackey MA, El-Sayed MA: **Nuclear targeting of gold nanoparticles in cancer cells induces DNA damage, causing cytokinesis arrest and apoptosis.** *J Am Chem Soc* 2010, **132**(5):1517-1519.
320. Xu C, Xie J, Kohler N, Walsh EG, Chin YE, Sun S: **Monodisperse magnetite nanoparticles coupled with nuclear localization signal peptide for cell-nucleus targeting.** *Chem Asian J* 2008, **3**(3):548-552.
321. Weissleder R, Elizondo G, Wittenberg J, Lee AS, Josephson L, Brady TJ: **Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: an intravenous contrast agent for assessing lymph nodes with MR imaging.** *Radiology* 1990, **175**(2):494-498.
322. Kalber TL, Smith CJ, Howe FA, Griffiths JR, Ryan AJ, Waterton JC, Robinson SP: **A longitudinal study of R2* and R2 magnetic resonance imaging relaxation rate measurements in murine liver after a single administration of 3 different iron oxide-based contrast agents.** *Invest Radiol* 2005, **40**(12):784-791.
323. Muldoon LL, Sandor M, Pinkston KE, Neuwelt EA: **Imaging, distribution, and toxicity of superparamagnetic iron oxide magnetic resonance nanoparticles in the rat brain and intracerebral tumor.** *Neurosurgery* 2005, **57**(4):785-796; discussion 785-796.
324. Schmidtke-Schrezenmeier G, Urban M, Musyanovych A, Mailander V, Rojewski M, Fekete N, Menard C, Deak E, Tarte K, Rasche V *et al*: **Labeling of mesenchymal stromal cells with iron oxide-poly(L-lactide) nanoparticles for magnetic resonance imaging: uptake, persistence, effects on cellular function and magnetic resonance imaging properties.** *Cytotherapy* 2011, **13**(8):962-975.
325. Huang HC, Chang PY, Chang K, Chen CY, Lin CW, Chen JH, Mou CY, Chang ZF, Chang FH: **Formulation of novel lipid-coated magnetic nanoparticles as the probe for in vivo imaging.** *J Biomed Sci* 2009, **16**:86.
326. Sun R, Dittrich J, Le-Huu M, Mueller MM, Bedke J, Kartenbeck J, Lehmann WD, Krueger R, Bock M, Huss R *et al*: **Physical and biological characterization of superparamagnetic iron oxide- and ultrasmall superparamagnetic iron oxide-labeled cells: a comparison.** *Invest Radiol* 2005, **40**(8):504-513.
327. Kim JS, Yoon TJ, Yu KN, Kim BG, Park SJ, Kim HW, Lee KH, Park SB, Lee JK, Cho MH: **Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice.** *Toxicol Sci* 2006, **89**(1):338-347.
328. Kwon JT, Hwang SK, Jin H, Kim DS, Minai-Tehrani A, Yoon HJ, Choi M, Yoon TJ, Han DY, Kang YW *et al*: **Body distribution of inhaled fluorescent magnetic nanoparticles in the mice.** *J Occup Health* 2008, **50**(1):1-6.
329. Kim BY, Rutka JT, Chan WC: **Nanomedicine.** *N Engl J Med* 2010, **363**(25):2434-2443.
330. Singh N, Jenkins GJ, Asadi R, Doak SH: **Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION).** *Nano Rev* 2010, **1**.
331. Halamoda Kenzaoui B, Chapuis Bernasconi C, Guney-Ayra S, Juillerat-Jeanerret L: **Induction of oxidative stress, lysosome activation and autophagy by nanoparticles in human brain-derived endothelial cells.** *Biochem J* 2011, **441**(3):813-821.
332. Hong SC, Lee JH, Lee J, Kim HY, Park JY, Cho J, Han DW: **Subtle cytotoxicity and genotoxicity differences in superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with various functional groups.** *Int J Nanomedicine* 2012, **6**:3219-3231.

333. Naqvi S, Samim M, Abdin M, Ahmed FJ, Maitra A, Prashant C, Dinda AK: **Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress.** *Int J Nanomedicine* 2010, **5**:983-989.
334. Ding J, Tao K, Li J, Song S, Sun K: **Cell-specific cytotoxicity of dextran-stabilized magnetite nanoparticles.** *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010, **79**(1):184-190.
335. Lunov O, Syrovets T, Rucker C, Tron K, Nienhaus GU, Rasche V, Mailander V, Landfester K, Simmet T: **Lysosomal degradation of the carboxydextran shell of coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles and the fate of professional phagocytes.** *Biomaterials* 2010, **31**(34):9015-9022.
336. Gole A, Stone JW, Gemmill WR, zur Loye HC, Murphy CJ: **Iron oxide coated gold nanorods: synthesis, characterization, and magnetic manipulation.** *Langmuir* 2008, **24**(12):6232-6237.
337. Mandal M, Kundu S, Ghosh SK, Panigrahi S, Sau TK, Yusuf SM, Pal T: **Magnetite nanoparticles with tunable gold or silver shell.** *J Colloid Interface Sci* 2005, **286**(1):187-194.
338. Mohammad F, Balaji G, Weber A, Uppu RM, Kumar CS: **Influence of Gold Nanoshell on Hyperthermia of Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs).** *J Phys Chem C Nanomater Interfaces* 2010, **1**(20):3141-3146.
339. Sethi T, Rozengurt E: **Gastrin stimulates Ca²⁺ mobilization and clonal growth in small cell lung cancer cells.** *Cancer Res* 1992, **52**(21):6031-6035.
340. Blaker M, Arrenberg P, Stange I, Schulz M, Burghardt S, Michaelis H, Pace A, Greten H, von Schrenck T, de Weerth A: **The cholecystinin2-receptor mediates calcitonin secretion, gene expression, and proliferation in the human medullary thyroid carcinoma cell line, TT.** *Regul Pept* 2004, **118**(1-2):111-117.
341. Kidd M, Siddique ZL, Drozdov I, Gustafsson BI, Camp RL, Black JW, Boyce M, Modlin IM: **The CCK(2) receptor antagonist, YF476, inhibits Mastomys ECL cell hyperplasia and gastric carcinoid tumor development.** *Regul Pept* 2010, **162**(1-3):52-60.
342. Thompson MD, Percy ME, McIntyre Burnham W, Cole DE: **G protein-coupled receptors disrupted in human genetic disease.** *Methods Mol Biol* 2008, **448**:109-137.
343. Pajares MJ, Ezponda T, Catena R, Calvo A, Pio R, Montuenga LM: **Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology.** *Lancet Oncol* 2007, **8**(4):349-357.
344. Ling K, Wang P, Zhao J, Wu YL, Cheng ZJ, Wu GX, Hu W, Ma L, Pei G: **Five-transmembrane domains appear sufficient for a G protein-coupled receptor: functional five-transmembrane domain chemokine receptors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(14):7922-7927.
345. Boot-Handford RP, Briggs MD: **The unfolded protein response and its relevance to connective tissue diseases.** *Cell Tissue Res* 2009, **339**(1):197-211.
346. Nakatsukasa K, Brodsky JL: **The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum.** *Traffic* 2008, **9**(6):861-870.
347. Robben JH, Kortenoeven ML, Sze M, Yae C, Milligan G, Oorschot VM, Klumperman J, Knoers NV, Deen PM: **Intracellular activation of vasopressin V2 receptor mutants in nephrogenic diabetes insipidus by nonpeptide agonists.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(29):12195-12200.
348. Harada N, Yamada Y, Tsukiyama K, Yamada C, Nakamura Y, Mukai E, Hamasaki A, Liu X, Toyoda K, Seino Y *et al*: **A novel GIP receptor splice variant influences GIP sensitivity of pancreatic beta-cells in obese mice.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008, **294**(1):E61-68.

349. Duran-Prado M, Gahete MD, Martinez-Fuentes AJ, Luque RM, Quintero A, Webb SM, Benito-Lopez P, Leal A, Schulz S, Gracia-Navarro F *et al*: **Identification and characterization of two novel truncated but functional isoforms of the somatostatin receptor subtype 5 differentially present in pituitary tumors.** *J Clin Endocrinol Metab* 2009, **94**(7):2634-2643.
350. Hayes GM, Carrigan PE, Dong M, Reubi JC, Miller LJ: **A novel secretin receptor splice variant potentially useful for early diagnosis of pancreatic carcinoma.** *Gastroenterology* 2007, **133**(3):853-861.
351. Terrillon S, Durroux T, Mouillac B, Breit A, Ayoub MA, Taulan M, Jockers R, Barberis C, Bouvier M: **Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis.** *Mol Endocrinol* 2003, **17**(4):677-691.
352. van Rijn RM, van Marle A, Chazot PL, Langemeijer E, Qin Y, Shenton FC, Lim HD, Zuiderveld OP, Sansuk K, Dy M *et al*: **Cloning and characterization of dominant negative splice variants of the human histamine H4 receptor.** *Biochem J* 2008, **414**(1):121-131.
353. Hague C, Uberti MA, Chen Z, Hall RA, Minneman KP: **Cell surface expression of alpha1D-adrenergic receptors is controlled by heterodimerization with alpha1B-adrenergic receptors.** *J Biol Chem* 2004, **279**(15):15541-15549.
354. Baggio LL, Drucker DJ: **Biology of incretins: GLP-1 and GIP.** *Gastroenterology* 2007, **132**(6):2131-2157.
355. McIntosh CH, Widenmaier S, Kim SJ: **Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (Gastric Inhibitory Polypeptide; GIP).** *Vitam Horm* 2009, **80**:409-471.
356. Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W: **Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus.** *J Clin Invest* 1993, **91**(1):301-307.
357. Mentis N, Vardarli I, Kothe LD, Holst JJ, Deacon CF, Theodorakis M, Meier JJ, Nauck MA: **GIP does not potentiate the antidiabetic effects of GLP-1 in hyperglycemic patients with type 2 diabetes.** *Diabetes* 2011, **60**(4):1270-1276.
358. Lynn FC, Pamir N, Ng EH, McIntosh CH, Kieffer TJ, Pederson RA: **Defective glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor expression in diabetic fatty Zucker rats.** *Diabetes* 2001, **50**(5):1004-1011.
359. Piteau S, Olver A, Kim SJ, Winter K, Pospisilik JA, Lynn F, Manhart S, Demuth HU, Speck M, Pederson RA *et al*: **Reversal of islet GIP receptor down-regulation and resistance to GIP by reducing hyperglycemia in the Zucker rat.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **362**(4):1007-1012.
360. Christ E, Wild D, Forrer F, Brandle M, Sahli R, Clerici T, Gloor B, Martius F, Maecke H, Reubi JC: **Glucagon-like peptide-1 receptor imaging for localization of insulinomas.** *J Clin Endocrinol Metab* 2009, **94**(11):4398-4405.
361. Irwin N, Gault V, Flatt PR: **Therapeutic potential of the original incretin hormone glucose-dependent insulinotropic polypeptide: diabetes, obesity, osteoporosis and Alzheimer's disease?** *Expert Opin Investig Drugs* 2010, **19**(9):1039-1048.
362. Leung-Theung-Long S, Roulet E, Clerc P, Escricut C, Marchal-Victorion S, Ritz-Laser B, Philippe J, Pradayrol L, Seva C, Fourmy D *et al*: **Essential interaction of Egr-1 at an islet-specific response element for basal and gastrin-dependent glucagon gene transactivation in pancreatic alpha-cells.** *J Biol Chem* 2005, **280**(9):7976-7984.
363. Siatkin SP, Frolov VA: **[The characteristics of thermal action on the stability of liver lysosomes in rats].** *Patol Fiziol Eksp Ter* 1990(4):13-15.

364. Haveman J: **The capacity of lysosomes of cultured mammalian cells to accumulate acridine orange is destroyed by hyperthermia.** *Cell Tissue Res* 1980, **213**(2):343-350.
365. Groth-Pedersen L, Jaattela M: **Combating apoptosis and multidrug resistant cancers by targeting lysosomes.** *Cancer Lett* 2010.
366. Kirkegaard T, Jaattela M: **Lysosomal involvement in cell death and cancer.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1793**(4):746-754.
367. Ivanov A, Beers SA, Walshe CA, Honeychurch J, Alduaij W, Cox KL, Potter KN, Murray S, Chan CH, Klymenko T *et al*: **Monoclonal antibodies directed to CD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by lysosome-mediated cell death in human lymphoma and leukemia cells.** *J Clin Invest* 2009, **119**(8):2143-2159.
368. Fichter KM, Flajolet M, Greengard P, Vu TQ: **Kinetics of G-protein-coupled receptor endosomal trafficking pathways revealed by single quantum dots.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(43):18658-18663.
369. Montet X, Montet-Abou K, Reynolds F, Weissleder R, Josephson L: **Nanoparticle imaging of integrins on tumor cells.** *Neoplasia* 2006, **8**(3):214-222.
370. Montet X, Weissleder R, Josephson L: **Imaging pancreatic cancer with a peptide-nanoparticle conjugate targeted to normal pancreas.** *Bioconjug Chem* 2006, **17**(4):905-911.
371. Ito A, Kuga Y, Honda H, Kikkawa H, Horiuchi A, Watanabe Y, Kobayashi T: **Magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes for combination of antibody therapy with hyperthermia.** *Cancer Lett* 2004, **212**(2):167-175.
372. Rodriguez-Luccioni HL, Latorre-Esteves M, Mendez-Vega J, Soto O, Rodriguez AR, Rinaldi C, Torres-Lugo M: **Enhanced reduction in cell viability by hyperthermia induced by magnetic nanoparticles.** *Int J Nanomedicine* 2011, **6**:373-380.
373. Marcos-Campos I, Asin L, Torres TE, Marquina C, Tres A, Ibarra MR, Goya GF: **Cell death induced by the application of alternating magnetic fields to nanoparticle-loaded dendritic cells.** *Nanotechnology* 2011, **22**(20):205101.
374. Liu Y, Miyoshi H, Nakamura M: **Nanomedicine for drug delivery and imaging: a promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles.** *Int J Cancer* 2007, **120**(12):2527-2537.
375. Khandhar AP, Ferguson RM, Simon JA, Krishnan KM: **Enhancing cancer therapeutics using size-optimized magnetic fluid hyperthermia.** *J Appl Phys* 2012, **111**(7):7B306-307B3063.
376. Khandhar AP, Ferguson RM, Krishnan KM: **Monodispersed magnetite nanoparticles optimized for magnetic fluid hyperthermia: Implications in biological systems.** *J Appl Phys* 2011, **109**(7):7B310-317B3103.