

Université de Sherbrooke

Utilisation d'analogues du bombesin dans le diagnostic
et le traitement du cancer du sein et de la prostate

Rédigé par
Céléna Dubuc

Département de médecine
nucléaire et radiobiologie

Mémoire par article présenté à la Faculté de
médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Science (M.Sc.)

Membres du jury :

François Bénard, co-directeur de maîtrise, dépt. Médecine nucléaire et radiobiologie
Johannes Van Lier, co-directeur de maîtrise dépt. Médecine nucléaire et radiobiologie

Benoît Paquette, dépt. Médecine nucléaire et radiobiologie

Fernand Jr. Gobeil, dépt. Pharmacologie

Décembre 2007



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 978-0-494-42953-2
Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-42953-2

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	IV
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	V
RÉSUMÉ.....	VIII
INTRODUCTION.....	1
1- Cancer.....	1
1.1- Cancer du sein.....	1
1.2- Cancer de la prostate.....	3
2- Bombesin.....	5
2.1-Description du bombesin.....	5
2.2- Rôle du bombesin.....	7
3- Radiotraceurs.....	14
3.1- Principe général des radiotraceurs.....	14
3.2- ^{64}Cu -DOTA-8-Aoc-BBN(7-14) NH_2 et ^{64}Cu -DOTA-8-Aoc-[D-Tyr 6 β Ala 11 Thi 13 Nle 14]BBN(7-14) NH_2	16
4- Imagerie TEP.....	18
4.1- Principe général de la TEP.....	18
4.2- Applications de l'imagerie TEP.....	21
5- Photothérapie.....	23
5.1- Principe général de la photothérapie.....	23
5.2- Photosensibilisateurs.....	23
5.3- Mécanismes d'action des photosensibilisateurs.....	25

OBJECTIFS DU PROJET.....	31
ARTICLE 1.....	33
ARTICLE 2.....	55
DISCUSSION.....	66
PERSPECTIVES D'AVENIR.....	72
CONCLUSION.....	75
REMERCIEMENTS.....	78
BIBLIOGRAPHIE.....	79
ANNEXES.....	94

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Principales voies de transduction du signal cellulaire engendrées par le bombésin.	9
Figure 2 : Cycle cellulaire.	10
Figure 3 : Cascade de signalisation cellulaire engendrée par le bombésin lors de l'invasion tumorale.	11
Figure 4 : Principe de la tomographie d'émission de positrons.	19
Figure 5 : Scanner TEP.	19
Figure 6 : Voies métaboliques impliquées dans la destruction de tumeurs par la thérapie photodynamique.	26
Figure 7 : Principe de la thérapie photodynamique.	27

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN: acide désoxyribonucléique

ALPcS₄A₁: aluminium phthalocyanine tetrasulfoné

APD: avalanche photodiode

ARN: acide ribonucléique

ARNm: acide ribonucléique messenger

β^+ : particule bêta plus ou positron, particule émise lors de la désintégration d'un neutron en proton

β^- : particule bêta moins, particule émise lors de la désintégration d'un proton en neutron

BB1: bombesin receptor subtype 1

BB2: bombesin receptor subtype 2

BB3: bombesin receptor subtype 3

BB4: bombesin receptor subtype 4

BBN: bombesin

BFGF: basic fibroblast growth factor

BGO: bismuth germinate

BRCA-1, BRCA-2: breast cancer 1 et 2, gènes impliqués de le développement de certains types de cancer du sein.

BRS-3: bombesin receptor subtype 3

BSA: albumine sérique bovine

Ca²⁺: forme ionique du calcium retrouvé dans la cellule

CB-DO2A4,10-bis(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazabicyclo[5.5.2]tetradécane

CB-TE2A : 4,11-bis(carboxymethyl)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadécane

c-jun: oncogène

c-fos: oncogène

CT: computed tomography

Cu-64: ⁶⁴cuivre, isotope radioactif du cuivre

DAG: 1,2-diacylglycerol

DOTA: 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid

EGF: epidermal growth factor

ERK: extracellular signal-regulated kinase

[¹⁸F]FDG: 2-deoxy-2-[¹⁸F]-fluoro-D-glucose

GDP: guanosine diphosphate

GFP: green fluorescent protein

GTP: guanosine triphosphate

GRP: gastrin-releasing peptide

GRPR: gastrin-releasing peptide receptor

IGF-II: insulin growth factor 2, hormone de croissance qui stimule la croissance cellulaire

IL-6: interleukine-6

IL-10: interleukine-10

IP₃: 3,4,5-triphosphate inositol

K_i: constante d'inhibition

LYSO: lutetium yttrium orthosilicate

MAPK: mitogen activated-protein kinase

MARCKS: acidic myristoylated alanine-rich c-kinase substrate

MMP-2: métalloprotéinase-2

MMP-9: métalloprotéinase-9

NF-κB: facteur de transcription nucléaire kappa B

NMBR: neuromedin-B receptor

p125_{FAK}: protéine (tyrosine) impliquée dans l'adhésion et la motilité cellulaire

Pc: phtalocyanines

PIP₂: phosphatidyl inositol 4,5-biphosphate

PKA: protéine kinase A

PKC: protéine kinase C

PLC: phospholipase C

PLC β : phospholipase C β

PLD: phospholipase D

PLA2: phospholipase A2

SarAr : 1-N-(4-aminobenzyl)-3,6,10,13,16,19-hexaazabicyclo[6.6.6]eicosane-1,8-diamine

TEP: tomographie d'émission de positron

TPD: thérapie photodynamique

uPA: urokinase-type plasminogen activator

VEGF-A: vascular endothelial growth factor-A, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

RÉSUMÉ

Un diagnostic précoce suivi d'un traitement efficace et bien adapté au type de cancer sont les deux aspects les plus importants dans le traitement du cancer.

L'imagerie par tomographie d'émission de positrons (TEP) est utilisée en oncologie pour le diagnostic ainsi que l'évaluation de la réponse à la thérapie. La TEP est l'outil le plus efficace dans la détection du cancer, des métastases ainsi que des récives. Le radiotracteur le plus utilisé présentement en clinique est le 2-deoxy-2-[^{18}F]-fluoro-D-glucose ([^{18}F]-FDG). Ce radiotracteur est un analogue du glucose qui permet de détecter les tumeurs et d'évaluer le métabolisme de ces cellules. En effet, les cellules tumorales ont généralement un métabolisme beaucoup plus élevé que les cellules normales. L'imagerie est donc basé sur l'accumulation du radiotracteur plus rapidement dans les cellules tumorales. Malheureusement, certains types de cellules cancéreuses tels que les cellules de cancer de la prostate ont un métabolisme peu élevé et alors, le [^{18}F]-FDG s'avère inefficace dans la détection de ces types de cancers. L'inverse est aussi vrai et pose également problème, c'est-à-dire que certains types de cellules saines ont un métabolisme élevé et, dans ces cas, le [^{18}F]-FDG est, là aussi, inadéquat, tel que dans le cas du cancer du cerveau, par exemple, où les cellules du cerveau ont un métabolisme très élevé en tout temps rendant l'imagerie de ce cancer impossible. Même si le [^{18}F]-FDG demeure un bon radiotracteur dans la majorité des cas, le développement de nouveaux radiotraceurs capables de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses présente des avantages indéniables.

Plusieurs traitements sont disponibles présentement en clinique pour traiter le cancer. Malheureusement, tous ces traitements comportent certaines lacunes dont la plus importante et la plus commune est la présence d'effets secondaires importants. Ces effets secondaires sont dus au manque de spécificité des molécules utilisées dans ces traitements. En effet, ces agents thérapeutiques ne ciblent pas spécifiquement les cellules cancéreuses mais bien toutes les cellules en division, causant aussi des dommages aux cellules saines.

La photothérapie est l'un de ces traitements éprouvés en clinique dont l'efficacité pour traiter certains types de cancers a déjà été démontrée. La présence d'un agent ciblant les cellules cancéreuses spécifiquement pourrait grandement améliorer l'efficacité et diminuer les effets secondaires.

Le bombésin est un peptide de 14 acides aminés qui est exprimé chez plusieurs types cellulaires et qui possède plusieurs fonctions de régulation dans l'organisme. Ainsi, il participe à la thermorégulation, en plus de provoquer la sécrétion de plusieurs enzymes pancréatiques. Ce peptide doit son nom à la grenouille *Bombina bombina* chez laquelle il fut d'abord isolé et séquencé. Par la suite, son équivalent humain, le gastrin-releasing peptide (GRP), fut découvert et son étude démontra que ce peptide est hautement conservé chez les différentes espèces. Quatre sous-types ont été identifiés chez la grenouille et trois chez l'humain. Les récepteurs à bombésin sont exprimés en très bas niveau chez plusieurs types cellulaires normaux, mais ils sont particulièrement surexprimés chez certains types de cancers tels que le cancer du sein et de la prostate. De plus, la surexpression de certains sous-types tels que le gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) est un indice de l'agressivité de la tumeur.

Notre premier objectif était donc de créer un radiopeptide qui se lierait spécifiquement à des récepteurs surexprimés dans les cas de cancer du sein et de la prostate, les GRPR pour permettre l'imagerie TEP de ces types de tumeurs. En combinant un analogue du bombésin avec un radioisotope, le Cu-64, nous voulions obtenir un radiotraceur plus spécifique que celui utilisé présentement en clinique.

Notre second objectif était d'évaluer le potentiel de ce même analogue du bombésin lié à un photosensibilisateur, l'AlPcS₄A₁, en tant qu'agent photosensibilisant dans l'utilisation de la thérapie photodynamique (TPD) dans le traitement du cancer de la prostate.

Mots clés : bombésin, peptide, cancer du sein, cancer de la prostate, radiotraceur, thérapie photodynamique

INTRODUCTION

1. Cancer

Le cancer est l'une des maladies les plus meurtrières de nos temps. Il survient lorsque le métabolisme d'une cellule se dérègle et que cette cellule se met à se diviser de manière incontrôlable, et ne répond plus à aucun signal venant du corps lui dictant de s'arrêter ou d'entrer en apoptose, forme de mort programmée destinée au maintien et au bon fonctionnement de l'organisme. Il existe plusieurs types de cancer ayant tous la même fin inévitable s'ils ne sont pas traités : la mort. Toutefois, certains types de cancer sont plus répandus ou encore plus agressifs que d'autres. Il existe plusieurs types de traitements contre le cancer, mais l'application d'un traitement dépend du grade du cancer c'est-à-dire de l'agressivité de ce dernier, qui se mesure par sa capacité à faire des métastases ainsi que par le stade auquel le développement du cancer est rendu, c'est-à-dire, s'il y a déjà présence ou non de métastases ainsi que leur localisation dans le corps. De nos jours, plusieurs types de cancer sont curables mais dans tous les cas, un diagnostic précoce et un traitement approprié sont essentiels.

1.1 Cancer du sein

Le cancer du sein est la forme de cancer la plus répandue chez la femme : 1 femme sur 9 risque de souffrir d'un cancer du sein et 1 sur 27 en mourra. En 2007, on estime que 22 300 canadiennes recevront un diagnostic de cancer du sein et 5 300 en mourront.

Le sein est constitué de glandes mammaires qui produisent le lait, de canaux galactophores qui le transporte et de tissu adipeux qui protège les glandes mammaires et les canaux galactophores. Deux principaux types de tumeurs peuvent se développer : le

carcinome lobulaire situé dans les glandes mammaires ou le carcinome canalaire situé dans les canaux galactophore. Ce dernier est le plus répandu. Il existe d'autres formes de cancer du sein tel que le cancer inflammatoire du sein ou la maladie de Paget, mais ces formes de cancer sont très rares.

Certains facteurs accroissent le risque de cancer du sein, principalement l'âge et les antécédents familiaux. Ainsi, une mutation dans le gène BRCA 1 ou BRCA 2 joue un rôle très important dans le développement de la maladie.

Une fois le diagnostic établi, plusieurs traitements sont disponibles selon le type, le grade et le stade du cancer. La chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie, et l'hormonothérapie sont les principaux traitements utilisés et ils peuvent tous être utilisés seuls ou en combinaison.

La chirurgie consiste à retirer une partie (chirurgie mammaire conservatrice) ou la totalité du sein (mastectomie). Ainsi, si la tumeur est petite et localisée, une chirurgie mammaire conservatrice sera préférée alors que si la tumeur est grosse et étendue, une mastectomie sera effectuée. Lors d'une chirurgie, la tumeur ainsi qu'une partie du tissu sain environnant sont retirées pour s'assurer que toutes les cellules cancéreuses sont bien enlevées.

La radiothérapie consiste à traiter en irradiant la tumeur, soit de l'extérieur avec des rayons-X, soit de l'intérieur en plaçant des grains radioactifs à l'intérieur du sein, c'est une forme de radiothérapie que l'on nomme la curiethérapie. Après une chirurgie, la

radiothérapie est souvent utilisée pour irradier le sein ou la paroi thoracique afin d'assurer une meilleure destruction de toutes les cellules cancéreuses.

La chimiothérapie consiste à administrer, généralement par voie orale ou intraveineuse des substances chimiques. Les agents employés en chimiothérapie agissent soit sur l'ADN, l'ARN ou encore les protéines et ce, de plusieurs manières. Ils peuvent par exemple bloquer certaines étapes de la division cellulaire pour empêcher la cellule de se diviser ou encore s'intercaler entre les bases et provoquer la cassure des brins d'ADN. Plusieurs protéines reliées à la réplication et la réparation de l'ADN peuvent également être ciblées par les agents chimiothérapeutiques. L'inhibition de la polymérisation de la tubuline qui est cruciale dans la formation du fuseau mitotique lors de la division cellulaire en est un bon exemple. D'autres encore, bloquent l'action des enzymes chargées de la réparation des bris dans les brins d'ADN. Par exemple, les agents intercalants qui s'intercalent dans la molécule d'ADN perturbant la structure, la réplication et la traduction en ARN. Ils inhibent également l'ADN polymérase et la topoisomérase II. La chimiothérapie est souvent utilisée dans le cas de métastases où le cancer n'est plus localisé et où il serait difficile par chirurgie ou radiothérapie d'enrayer la maladie.

1.2 Cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est le type de cancer le plus répandu chez les canadiens. En 2007, environ 22 300 canadiens recevront un diagnostic de cancer de la prostate et 4 300 en mourront. Un homme sur huit risque de souffrir d'un cancer de la prostate au cours de sa vie et 1 sur 27 en mourra.

La prostate est une glande du système reproducteur mâle qui sert principalement à fabriquer le liquide séminal. Elle est située sous la vessie, à la base du pénis. Le cancer prend naissance dans la partie glandulaire de la prostate, c'est pourquoi il est appelé adénocarcinome.

Le cancer de la prostate est surtout relié à l'âge et apparaît généralement chez les hommes plus âgés. Le développement de tumeurs varie de lent à modérément rapide et puisqu'il touche surtout les hommes plus âgés, plusieurs survivent un certain temps même après l'apparition de métastases, tandis que d'autres finissent par mourir d'une autre cause sans jamais avoir ressenti les effets de leur cancer de la prostate.

Le cancer de la prostate se différencie de la plupart des autres types de cancer par le métabolisme de ses cellules cancéreuses. En effet, contrairement à la plupart des autres types de cancer où le métabolisme des cellules tumorales est très élevé, ce qui est une caractéristique souvent utilisé pour détecter le cancer, les cellules du cancer de la prostate ont un métabolisme très lent.

Les traitements du cancer de la prostate sont similaires à ceux du cancer du sein et inclus : la chirurgie, la radiothérapie et l'hormonothérapie. Dans le cas de la chirurgie l'ablation complète de la prostate est nécessaire et dépend du grade et du stade du cancer. En radiothérapie, tout comme dans le cas du cancer du sein, des rayons-X externes de hautes énergies ou une source de radiation interne (curiethérapie) sous forme de grains radioactifs insérés dans la prostate sont utilisés. Finalement, l'hormonothérapie consiste en l'injection ou la prise de comprimés visant à diminuer le taux de testostérone ou à bloquer ses effets.

2. BOMBESIN

2.1 Description du bombesin

Le bombesin (BBN) est un peptide de 14 acides aminés qui fut isolé pour la première fois de la peau de *Bombina Bombina*, une grenouille originaire d'Europe, en 1971 par le groupe d'Anastasi (ANASTASI, et al., 1971). Ce peptide est également retrouvé chez certaines cellules neuronales et neuroendocrines. Les peptides de la famille du bombesin se retrouvent dans le système nerveux central ainsi que le tractus gastro-intestinal et sont stockés dans des vésicules (MOODY et al., 1983). Quatre sous-types de récepteurs à bombesin ont été découverts jusqu'à maintenant, soit les « bombesin receptor subtype » 1 à 4 (BB1, BB2, BB3, et BB4) (NAGALLA et al., 1995).

L'équivalent humain du bombesin est le gastrin-releasing peptide (GRP), un peptide de 27 acides aminés qui fut d'abord considéré comme étant l'équivalent mammalien exact du bombesin puisqu'ils démontraient tous deux des effets biologiques semblables (REUBI, 2003). Par contre, en 1995, le groupe de Nagalla (NAGALLA et al., 1995) démontra que le bombesin et le GRP étaient bien deux peptides distincts puisque que les amphibiens possédaient les deux. Chez l'humain par contre, on ne retrouve que le GRP et seulement trois sous-types ont été découverts à ce jour, soit le gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) que l'on retrouve dans le tractus gastro-intestinal de l'œsophage au rectum, le neuromedin-B receptor (NMBR) retrouvé dans la muscularis mucosa de l'œsophage et le BBN receptor subtype 3 (BRS-3) présent dans les cellules des poumons et des testicules (FATHI et al., 1993), (HALMOS et al., 1995). Seul le ligand naturel de BRS-3 n'est pas encore connu à ce jour, alors que pour les deux autres sous-types de récepteurs, le ligand naturel et le récepteur portent le même nom (MAINA et al., 2005). Les trois sous-types font partie de la super famille des récepteurs à sept domaines

transmembranaires couplés à des protéines G, et ils induisent la transduction du signal par plusieurs voies différentes impliquant fréquemment une mobilisation rapide du calcium intracellulaire via ces protéines G (APRIKIAN et al., 1996).

Tous les sous-types de récepteurs BBN et GRP découverts jusqu'à maintenant sont hautement conservés entre les diverses familles de récepteurs ainsi que les diverses espèces (MARKWALDER et REUBI, 1999). Ils font tous preuve d'une forte homologie en acides aminés dans leur partie C-terminal, où se retrouve leur activité biologique. De plus, une modification ou une délétion de l'acide aminé 14 confère des propriétés agonistiques ou antagonistiques selon la modification ou la délétion (APRIKIAN et al., 1996), (HOFFMAN et al., 2001). Ces ligands ont également la particularité de se lier à leur récepteur avec une très grande affinité (ROZENGURT, 1986).

Le sous-type GRPR est le plus étudié puisqu'il est fréquemment surexprimé dans plusieurs types de cellules cancéreuses, tel que le cancer de la prostate malin, où le sous-type GRPR est le plus fréquemment retrouvé (PLONOWSKI et al., 2000), (MAINA et al., 2005). Ce sous-type est également associé à la transformation néoplasique des cellules, et il peut aussi être un indicateur de l'agressivité de la tumeur (MARKWALDER et REUBI, 1999), (YANG et al., 2004). En temps normal, le GRPR est retrouvé uniquement dans le pancréas (XIAO et al., 2001).

2.2 Rôle du bombésin

Le bombésin est impliqué dans plusieurs fonctions de l'organisme : la thermorégulation, la chimiotaxie, la contraction de muscles lisses tel que ceux de l'intestin et de la vésicule biliaire, l'augmentation de la satiété, le relâchement de plusieurs peptides gastro-intestinal et la stimulation de la sécrétion d'enzymes pancréatiques. Le bombésin possède également un rôle dans la croissance des cellules normales et de certains types de cellules cancéreuses. Le cancer du poumon à petites cellules en est un exemple où le bombésin y joue le rôle d'un facteur autocrine de croissance cellulaire (MANTEY et al., 1993), (DESCHODT-LANCKMAN et al., 1976).

Dans le tractus gastro-intestinal, il agit en tant qu'hormone paracrine ainsi qu'en tant que facteur de croissance dans le développement des poumons (NAGALLA et al., 1995). Le GRP est également capable de stimuler le relâchement de plusieurs autres hormones gastro-intestinal tels que l'insuline, le glucagon, certains peptides polypancréatiques, la cholecystokinine, la somatostatine, la motiline, les polypeptides insulino-tropique dépendant du glucose, les polypeptides vasoactifs intestinal ainsi que l'entéroglucagon (PRESTON et al., 1996), (YEGEN, 2003).

On retrouve aussi le bombésin dans le cerveau où il agit en tant que neurotransmetteur (NAGALLA et al., 1995). Au niveau du cerveau, le bombésin est impliqué dans l'activation des axes hypothalamo-adréno-pituitaire et cérébro-gastrique ainsi que dans la régulation des cycles éveil-sommeil et de la faim (SCOPINARO et al., 2002).

En plus de ses multiples rôles dans le fonctionnement normal de l'organisme, le bombésin/GRP joue également un rôle important dans le développement de plusieurs types de cancers, en particulier les cancers du sein, du poumon, du colon, de l'estomac et de la prostate (OKARVI et AL-JAMMAZ, 2003), (APRIKIAN et al., 1998). Alors que les agonistes de GRPR accroissent significativement la motilité *in vitro* ainsi que la capacité d'invasion des cellules, et que les antagonistes suppriment la croissance de cellules *in vitro*, le BBN/GRP, un agoniste de GRPR, devient également un puissant mitogène impliqué dans la progression tumorale lors du développement de cancers (HALMOS et al., 1995), (STANGELBERGER et al., 2006). Le BBN/GRP ainsi que les autres membres de cette famille possèdent l'intrigante caractéristique de pouvoir induire la synthèse d'ADN et la division cellulaire en absence d'autres mitogènes (ROZENGURT, 1998).

Les GRPR sont présents dans 74% des cas de cancer de la prostate (REUBI et al., 2002). De plus, alors que l'incidence de GRPR est faible dans les cas de néoplasies bénignes, il est présent dans près de 50% des cas de cancers androgène-indépendant, type de cancer généralement associé à un mauvais pronostic et un faible taux de survie (SMITH et al., 2003), (XIAO et al., 2005).

Chez les cellules de cancer du sein, il y a également surexpression de GRPR mais il a été démontré (GIACCHETTI et al., 1990) que chez ce type de tumeurs, le GRP possède un rôle fonctionnel plutôt qu'un rôle de médiateur de la croissance cellulaire. En effet, chez ces cellules, lorsqu'on utilise un milieu de culture sans sérum, le bombésin n'affecte pas la croissance cellulaire.

Ainsi, autant dans le développement normal que dans le développement du cancer, le BBN/GRP joue plusieurs rôles. L'activation des récepteurs à BBN/GRP entraîne plusieurs réactions : une permuation de phosphatidylinositol, l'activation de la protéine kinase C (PKC) et des phospholipases C β , D et A2 (PLC β , PLD, PLA2), la phosphorylation de plusieurs protéines dont les « mitogen-activated protein kinase » (MAPK), les « extracellulaires signal-regulated kinase » (ERK) ERK1 et ERK2 ainsi que plusieurs protéines des plaques d'adhérences. Il peut aussi induire la phosphorylation de la tyrosine p125_{FAK}, une protéine impliquée dans l'adhésion et la motilité cellulaire (APRIKIAN, 1996). L'activation de ce récepteur entraîne également une élévation du taux de calcium cytosolique menant à une expression d'oncogènes précoces tel que *c-jun* et *c-fos* qui résulte en une croissance et une prolifération cellulaire accrues (SAURIN et al., 2000), (BAIDOO et al., 1998), (APRIKIAN et al., 1997, 1998), (BAJO et al., 2004).

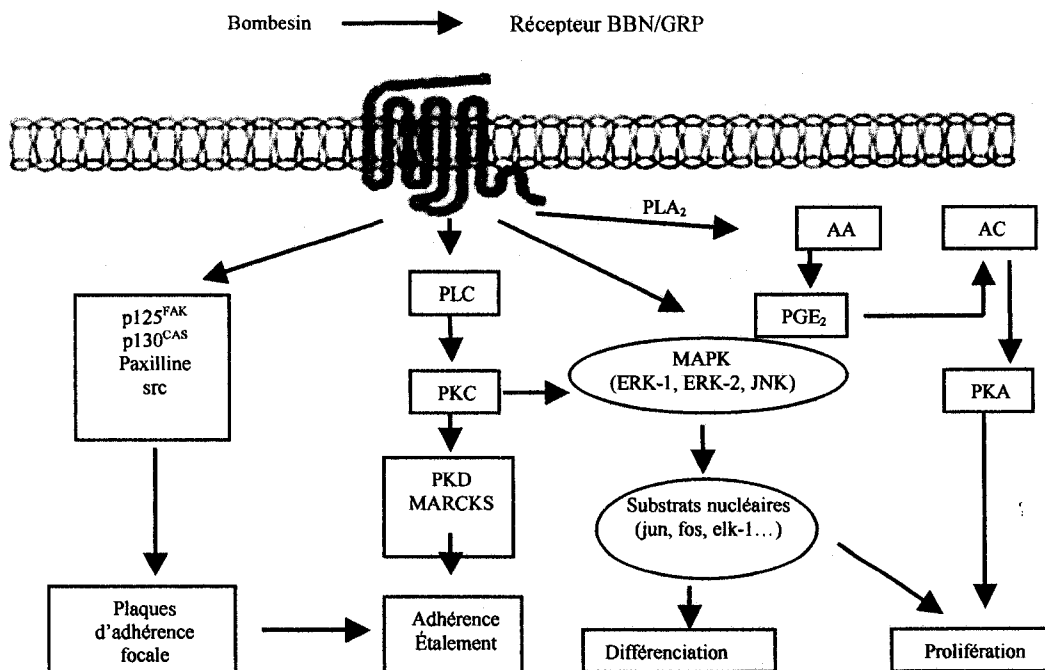


Figure 1 : Principales voies de transduction du signal cellulaire engendrées par le bombésin.

Image modifiée de SAURIN et al., 2000.

De plus, l'addition d'un inhibiteur sélectif de la protéine kinase A (PKA) bloque totalement la capacité du bombesin à induire l'expression de *c-fos*, ce qui suggère que PKA est une composante majeure de la stimulation de la croissance cellulaire par le bombesin (BENYA et al., 1994). La présence du BBN/GRP affecte aussi la production des protéines bFGF, IGF-II et VEGF-A impliquées dans l'angiogenèse en augmentant le nombre d'ARNm de ces protéines. Lorsqu'elles sont activées, ces protéines entraînent une augmentation des métalloprotéinases-2 et -9 (MMP-2 et MMP-9), qui sont responsables de la migration et de l'invasion des cellules cancéreuses (BAJO et al., 2004). Finalement, le BBN induit l'accumulation de la cycline D1 en fin de phase G₁ ainsi que de la cycline E. Donc, le BBN promouvoit la progression de la cellule en phase S (SANTISKULVONG et al., 2001), (ROZENGURT, 1998).

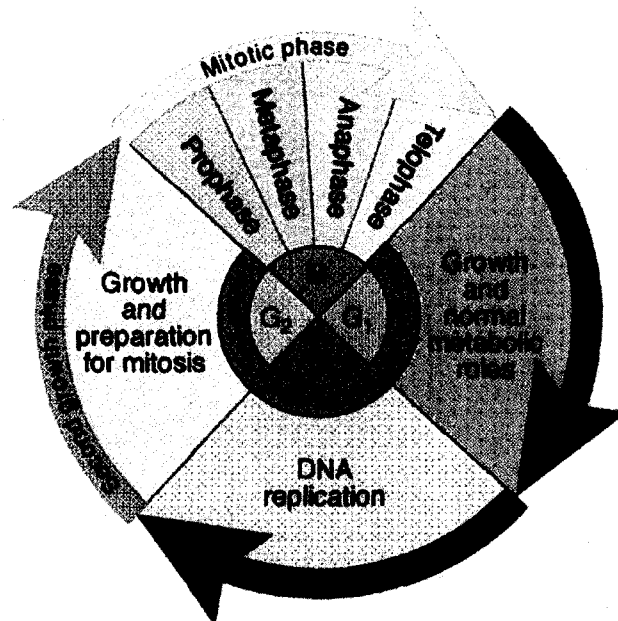


Figure 2 : Cycle cellulaire

Image reproduite de <http://bhs.smuhsd.org>

Le bombésin peut également réguler l'invasion des cellules en contrôlant la sécrétion et la captation de «l'urokinase-type plasminogen activator» (uPA) et de la MMP-9, deux protéines impliquées dans l'invasion cellulaire (FESTUCCIA et al., 1998), (NELSON et al., 2000). Le bombésin active MMP-9 via la sous-unité $\beta 1$ de l'intégrine qui stimule la plasma membrane-linked uPA qui active à son tour MMP-9 (FESTUCCIA et al., 2002).

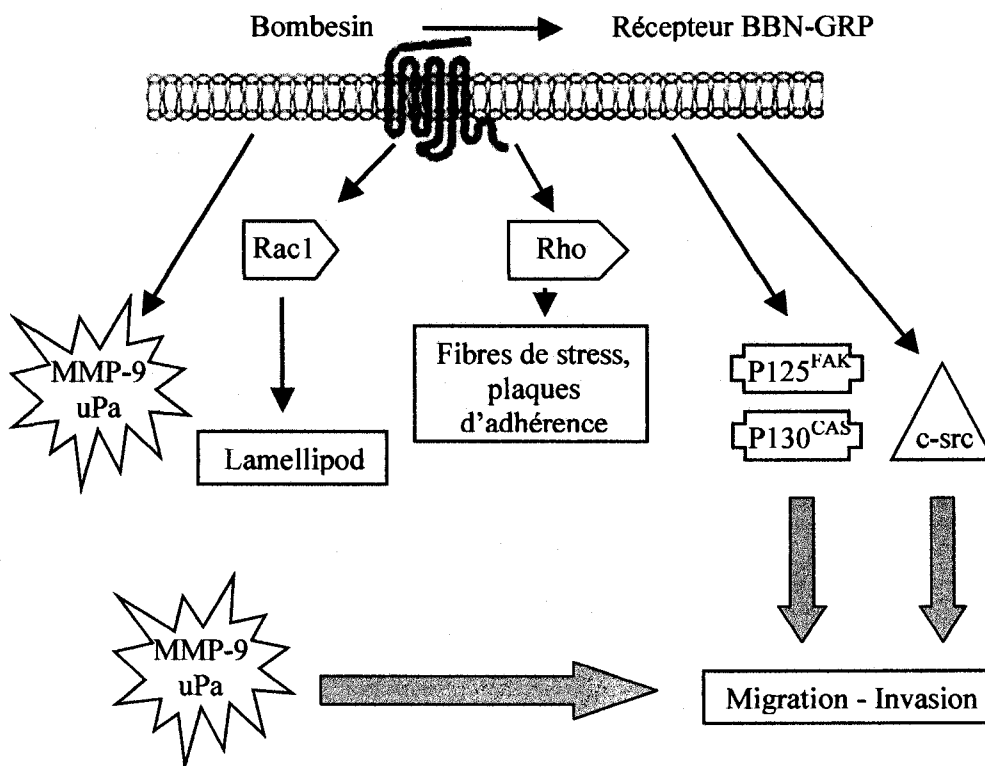


Figure 3 : Cascade de signalisation cellulaire engendrée par le bombésin lors de l'invasion tumorale.

Image modifiée de SAURIN et al., 2000.

Étant donné les rôles très diversifiés dans lesquels le BBN/GRP est impliqué, il fut d'abord suggéré que chacun des différents sous-types de GRPR étaient responsables d'un certain nombre de rôles en particulier, mais il fut démontré en 1998 (ROZENGURT, 1998) que seul le sous-type GRPR (qui médie l'activation de PLC β et de p125^{fak}) est responsable de tous les effets observés.

Le fonctionnement précis de BBN/GRP est encore mal connu jusqu'à ce jour puisqu'il est impliqué dans plusieurs cascades d'activation et voies de signalisation. Toutefois, quelques unes sont mieux connues (figures 1 et 3).

Il y a tout d'abord la liaison de BBN/GRP à la sous-unité G_q de la protéine hétérotrimérique G qui entraîne sa dissociation en deux sous-unité : G_{αq} et G_{βγ}. La sous-unité G_{αq} échange alors un GDP lié pour un GTP. Le complexe GTP-G_{αq} résultant active alors l'isoforme β de PLC qui catalyse l'hydrolyse du phosphatidyl inositol 4,5-biphosphate (PIP₂) dans la membrane plasmique qui produit en retour deux second messagers : le 1,2-diacylglycerol (DAG) et le 3,4,5-triphosphate inositol (IP₃). Suite à l'activation de ces deux second messagers, le premier, IP₃, provoque le relâchement de calcium (Ca²⁺) intracellulaire qui est l'un des signaux synergiques stimulant la transition de la phase G₀ à la synthèse d'ADN. Quant au DAG, il active les isoformes α, β, γ, δ, ε, η et θ de PKC. Le bombésin stimule donc la translocation de PKCδ et PKCε à la membrane plasmique ce qui augmente la phosphorylation du substrat de PKC, le substrat de la kinase C riche en alanine myristolé (MARCKS), une protéine qui se lie à la calmoduline et à l'actine, deux protéines essentielles au développement normal (ROZENGURT, 1986). Il y a donc translocation du cytosol à la membrane entraînant une rétroinhibition de ce substrat, un processus qui inverse la forte augmentation d'expression de MARCKS

qui se produit lorsque la cellule passe en G_0 . Le PKC joue également un rôle important dans la médiation de la transmodulation du récepteur «epidermal growth factor» (EGF) induit par le bombésin ainsi que l'activation de l'antiport Na^+/H^+ (ROZENGURT, 1998), (HERGET et ROZENGURT, 1994). Lorsque le PKC phosphoryle MARCKS, cette dernière est transloquée au cytoplasme, relâchant ainsi la calmoduline. Le bombésin peut également induire la rétroinhibition de MARCKS via un mécanisme post-transcriptionnel (HERGET et ROZENGURT, 1994).

Le bombésin induit également une forte activation de $p42^{mapk}$ et de $p44^{mapk}$ via une voie indépendante de PKC et qui ne semble pas impliquer $p21^{ras}$ ni $p74^{raf-1}$. Ceci distingue l'activation de ERK par le bombésin de l'activation de ERK induit par les récepteurs tyrosines kinases de G_i qui implique l'activation de $p74^{raf-1}$ via Ras/GTP. Toutefois, le mécanisme par lequel PKC active ERK demeure inconnu (ROZENGURT, 1998).

Le bombésin possède aussi la capacité d'induire le relâchement d'acide arachidonique qui est ensuite converti en prostaglandines de type E qui élève le niveau d'AMPc intracellulaire (ROZENGURT, 1998).

3. RADIOTRACEURS

3.1 Principe général des radiotraceurs

Pour être un bon radiotraceur, le radiopeptide doit être très efficace et posséder une très bonne activité spécifique de manière à permettre l'utilisation d'une très petite quantité et ainsi ne pas perturber le processus biochimique que l'on veut imager. Il doit également être non-invasif et pouvoir être fabriqué et utilisé rapidement pour ne pas qu'il y ait trop de décroissance radioactive. Le radiopeptide doit permettre une imagerie rapide du corps entier pour obtenir une bonne analyse de l'étendue de la maladie. De plus, le ratio cible-non-cible doit être élevé pour obtenir une bonne imagerie.

Le peptide utilisé dans l'élaboration du radiotraceur doit conserver son activité biologique ainsi qu'une haute affinité pour son récepteur une fois lié. Il doit préférentiellement être un agoniste pour permettre son internalisation (VAN DE WIELE et al., 2000). La complexation du peptide avec le radioisotope doit donner un bon rendement (99% et plus), et une fois lié, le radiopeptide doit également être très stable en conditions physiologiques et facilement excrété pour éviter au patient d'être exposé aux radiations trop longtemps (HEPPELER et al., 2000).

L'espaceur utilisé pour séparer le peptide du radioisotope joue également un rôle très important puisqu'il peut faire varier les propriétés physico-chimiques du radiopeptide ainsi que la façon dont il sera métabolisé. Il peut donc participer à l'accumulation du radiopeptide dans la tumeur ou encore favoriser la clairance sanguine ainsi que la clairance des organes non-visés. L'espaceur et le chélateur utilisés peuvent modifier la valeur de la constante d'inhibition (K_i) (HOFFMAN, QUINN et VOLKERT, 2001).

Le radioisotope choisi a aussi une grande importance puisqu'il ne doit pas affecter de manière négative l'affinité et les performances *in vivo* du radiopeptide (HOFFMAN, QUINN et VOLKERT, 2001). Finalement le radioisotope utilisé doit avoir une demi-vie appropriée au type d'imagerie voulue puisqu'une demi-vie trop courte ne permettra pas d'obtenir une bonne image alors qu'une demi-vie trop longue entraînera une dose de radiation plus grande et non nécessaire (SAHA, 2003). Parmi les radioisotopes les plus couramment utilisés en imagerie TEP, on retrouve le Fluor-18, le cuivre-64, le carbone-11, l'azote-13, l'oxygène-15, le gallium-68 et l'iode-124.

Le cuivre est responsable de plusieurs processus enzymatiques et il peut se lier à plusieurs protéines plasmatiques tel que la métallothionéine, les ATPases transporteurs de cuivre, le cytochrome oxidase et la superoxide dismutase. Les hépatocytes du foie sont les principales cellules impliquées dans l'homéostasie du cuivre (DI BARTOLO et al., 2001), (BOSWELL et al., 2004). Le cuivre peut être remis en circulation en se liant à la céruloplasmine dans le foie. Toutefois, une quantité excessive de cuivre mène à une oxydation des biomolécules et à des dommages cellulaires (BISSIG et al., 2005).

Le Cu-64 est un radioisotope émetteur de β^+ à environ 18%, de β^- à environ 39% ainsi que de capture électronique avec émission d'électrons Auger à environ 45%. Le Cu-64 émet un bon taux de positrons et un flux adéquat de photons d'annihilation de 511keV ce qui permet l'imagerie TEP. Les électrons Auger émis ainsi que les émissions β^- permettent également de tuer les cellules situées dans un court rayon. Donc, lorsque bien ciblé, par exemple couplé à un peptide tel que le bombésin, le Cu-64 peut servir de traitement pour les tumeurs de petite à moyenne taille en plus d'être utile en imagerie TEP (YANG et al., 2006). Il possède une demi-vie de 12.8 heures et peut être produit

dans un cyclotron ou un réacteur (HEPPELER et al., 2000). Le Cu-64 se transforme en Zn-64 qui est un isotope stable (DI BARTOLO et al., 2001).

3.2 ^{64}Cu -DOTA-8-Aoc-BBN(7-14) NH_2 et ^{64}Cu -DOTA-Aoc-[D-Tyr 6 Ala 11 Thi 13 Nle 14] BBN(6-14) NH_2

Le DOTA-8-Aoc-BBN(7-14) NH_2 fut développé et étudié par le groupe de Hoffman en 2003. Lors de leur étude, ils testèrent plusieurs analogues du bombesin couplés à différents espaceurs en utilisant l'In-111 comme radioisotope. Le DOTA-8-Aoc-BBN(7-14) NH_2 s'est avéré être le plus efficace de tous les radiopeptides testés (HOFFMAN et al., 2003). C'est pourquoi nous l'avons repris en y intégrant un Cu-64 plutôt que l'In-111 nous permettant ainsi de faire de l'imagerie TEP et éventuellement de mener au traitement de la tumeur.

Nous avons par la suite développé un autre radiopeptide qui, selon les études réalisées était plus stable que le premier. En effet, les peptides naturels ont le désavantage d'être rapidement dégradés *in vivo* (BREEMAN et al., 1999). Plusieurs groupes se sont penchés sur la question et ont depuis mis au point des analogues du bombesin ayant des résidus d'acides aminés synthétiques qui se sont avérés plus résistants à la dégradation *in vivo* (MANTEY et al., 1997), (SCHUHMACHER et al., 2005), (Zhang, 2007). Le DOTA-Aoc-[D-Tyr 6 Ala 11 Thi 13 Nle 14]BBN(6-14) NH_2 est l'un de ces analogues du BBN comprenant des résidus d'acides aminés synthétiques. Nous avons donc choisi de l'évaluer parallèlement au DOTA-8-Aoc-BBN(7-14) NH_2 dans le but de vérifier si l'on pouvait obtenir avec cet analogue une accumulation plus grande dans les tumeurs ainsi que de meilleures images.

Le ^{64}Cu -DOTA-8-Aoc-BBN(7-14) NH_2 et le ^{64}Cu -DOTA-Aoc-[D-Tyr 6 β Ala 11 Thi 13 Nle 14]BBN(6-14) NH_2 sont deux analogues du bombesin comprenant la séquence en C-terminale d'acides aminés essentiels à sa liaison spécifique avec son récepteur (BBN/GRPR). Il fut également démontré que cette séquence se lie de manière agonistique au GRPR. Les peptides sont couplés au DOTA, un chélateur, qui sert à lier le radioisotope (Cu-64) via le 8-Aoc, une chaîne de carbones qui sert d'espaceur pour séparer l'analogue du bombesin du complexe chélateur-radioisotope de manière à éviter l'encombrement stérique qui pourrait empêcher la liaison ligand-récepteur (HOFFMAN et al., 2003).

Le choix du chélateur joue un rôle très important car sa longueur, sa composition et ses propriétés physico-chimiques ont une influence sur l'affinité du radiopeptide pour son récepteur ainsi que la résidualisation de la radioactivité dans les cellules et la pharmacocinétique de l'analogue du bombesin. Le DOTA a été choisi comme chélateur car il est reconnu pour chélater de manière inerte les radiométaux en plus d'être stable thermodynamiquement. De plus, il a déjà été accepté pour des utilisations *in vivo* avec plusieurs radiométaux trivalents (HOFFMAN et al., 2003).

4. IMAGERIE TEP

4.1 Principe général de la TEP

L'imagerie par tomographie d'émission de positron (TEP) est une imagerie non-invasive de type moléculaire qui permet de voir une distribution spatiale et temporelle d'un composé couplé à un radionucléide émettant des positrons (émission β^+) (CHERRY et GAMBHIR, 2001). Les noyaux qui ont un excès de protons par rapport aux neutrons décroissent par émissions β^+ ou par capture électronique lorsque la transition est possible. Lors d'une émission β^+ , un proton disparaît et un neutron apparaît tandis qu'un positron et un neutrino sont émis. Le positron émis parcourt une courte distance (environ quelques dixièmes de millimètre) avant de rencontrer un électron. Il s'annihile alors en formant deux photons (rayons gamma) de 511keV qui sont émis dans des directions opposées. Ces deux photons ont toujours une énergie de 511keV et ce, peu importe le radioisotope. Ce sont ces photons qui sont à l'origine de la détection de la TEP. En effet, les photons entrent dans le tube photomultiplicateur du détecteur et frappe le scintillateur formé de cristaux. Les cristaux transforment alors cette énergie en lumière (DEFRISE et TREBOSEN), (CHERRY et GAMBHIR). Donc, les détecteurs détectent les photons, le scanner enregistre les données, que l'on nomme évènements puis l'image est reconstruite à l'aide d'algorithmes mathématiques.

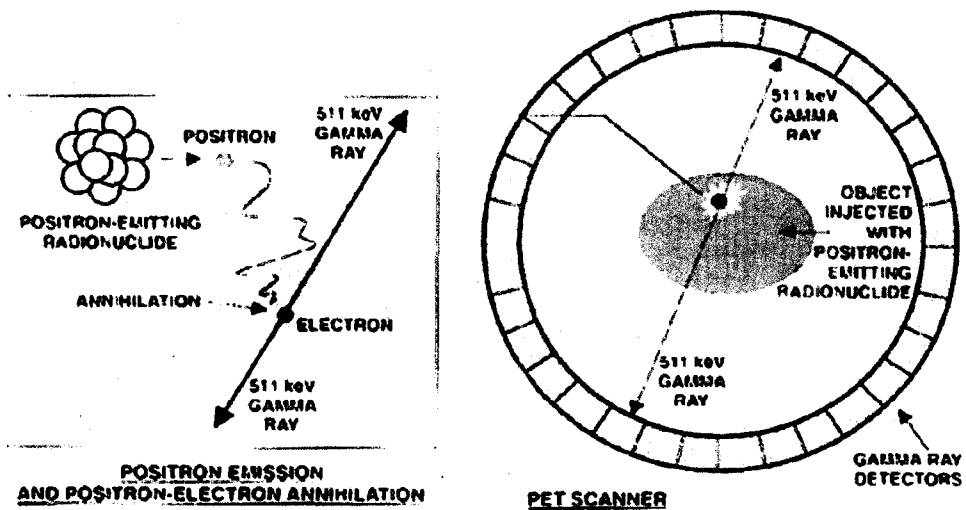


Figure 4- Principe de la tomographie d'émission de positrons

Gauche : Annihilation d'un positron émis par un radioisotope selon une émission β^+ avec un électron et formant deux photons de 511keV. Ces photons seront détectés simultanément par l'anneau de détection du scanner.

Droite : Principe d'un anneau de détection de scanner TEP.

Figure reproduite de CHERRY et GAMBHIR, 2001

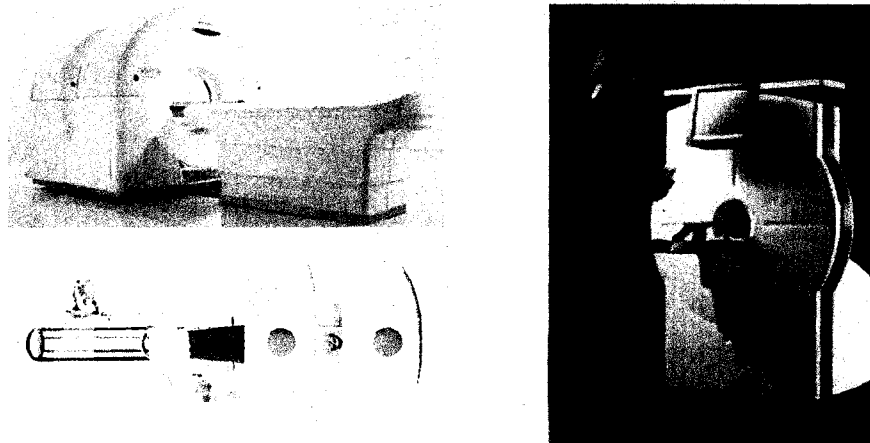


Figure 5- Scanner TEP

Gauche : Scanner TEP humain (scanner double composé d'un TEP et d'un computed tomography (CT), permettant d'obtenir une image à la fois fonctionnelle et anatomique).

Droite : Scanner TEP pour petits animaux.

Images de : www.rmcpet.org (*gauche*) et www.medicalimagingmag.com (*droite*)

Tout radioisotope qui décroît par émission de positron peut être utilisé pour l'imagerie TEP. Par contre, puisque tous les photons émis ont une énergie de 511keV peu importe le radioisotope, on ne peut imager deux radioisotopes différents au même moment puisque le scanner ne peut différencier les deux radioisotopes. Deux types d'imageries sont possibles avec un scanner TEP. Le premier type d'imagerie est une imagerie « statique » où le sujet scanné ne bouge pas et où l'image obtenue est un volume en trois dimensions. Le deuxième type d'imagerie est une imagerie « dynamique » où l'on peut voir l'accumulation du radioisotope dans le temps. Finalement, il est possible, à l'aide d'un programme informatique spécial de tracer des régions d'intérêts et de déterminer la quantité de radioisotope dans des endroits ou organes d'intérêt.

L'imagerie TEP est une imagerie de type fonctionnelle et non anatomique, c'est-à-dire, qu'elle permet de voir un processus biologique à l'intérieur de l'organisme et non des structures tels que les os, le foie ou le coeur comme le fait l'imagerie par résonance magnétique. Le processus biologique visualisé dépend du radiotracteur et de son rôle dans le métabolisme. Ainsi, le radiotracteur le plus utilisé en clinique, le 2-deoxy-2-[18]Fluoro-D-deoxyglucose 18[F]FDG qui est un analogue du glucose, une importante source d'énergie pour les cellules, est accumulé plus rapidement dans les cellules ayant un métabolisme plus élevé, tel que les cellules cancéreuses. C'est ainsi que l'on peut visualiser plusieurs types de cancer, mais ce que l'on image est en fait le métabolisme cellulaire et non les cellules cancéreuses directement. De plus, le 18[F]FDG est incapable de détecter efficacement certains types de tumeurs primaires et de métastases, de différencier de manière fiable une hyperplasie d'un cancer de la prostate ou même de détecter un carcinome confiné à cet organe (CHEN et al., 2004).

Dans le cadre de l'imagerie TEP, les radioisotopes sont rarement utilisés seuls puisqu'ils ne participent à aucun processus biologique. On les utilise plutôt liés à une molécule ou un composé généralement retrouvé dans le corps, tel une source d'énergie, une hormone, un peptide ou encore un anticorps ou toute autre molécule qui elle est requise dans un processus biologique.

Dans les études animales, la TEP permet de faire une étude longitudinale où l'animal peut être son propre contrôle puisque cette technique est non-invasive et ne nécessite pas le sacrifice de l'animal. La reproductibilité de l'étude en est alors améliorée (CHERRY et GAMBHIR, 2001). Le scanner TEP du Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke (CIMS) est un scanner de type avalanche photodiode (APD) qui comprend 512 détecteurs au total répartis sur deux anneaux de 15.5cm de diamètre (LECOMTE et al., 1996). Les cristaux des détecteurs sont des cristaux de LYSO et BGO. L'appareil possède une fenêtre de coïncidence de 40ns, une dimension de pixels de 3 X 5 X 20mm et une résolution de 14 μ l. Finalement, le champs axial est de 2.5cm.

4.2 Applications de l'imagerie TEP

Outre l'oncologie, l'imagerie TEP possède plusieurs autres applications, autant en recherche qu'en clinique. Puisque la TEP est une modalité d'imagerie fonctionnelle basée sur la détection d'une molécule radioactive, il est possible d'incorporer cette molécule radioactive à plusieurs molécules biologiques et ainsi visualiser différents types de processus physiologiques et biochimiques. Combinée à des modèles mathématiques, la TEP permet de déterminer la consommation de glucose ou d'oxygène des cellules (BENTZEN et al., 2003). La perfusion sanguine après un infarctus (CROTEAU et al., 2003) peut également être déterminée à l'aide de la TEP. En plus de ces applications,

l'imagerie TEP est aussi utilisée en neurologie où elle permet de visualiser certaines maladies dégénératives tel que l'Alzheimer (HUNT et al., 2007). Dans ces deux derniers domaines, l'imagerie TEP est basée sur le principe que les cellules mortes n'ont aucun métabolisme et donc n'accumule pas le FDG contrairement aux cellules saines. Il est ainsi possible de voir les zones nécrotiques du cerveau ou du cœur. La biologie moléculaire utilise aussi la TEP, particulièrement en recherche où plusieurs processus biologiques peuvent être étudiés en liant un radioisotope soit à la molécule que l'on veut étudier tel que la superoxide dismutase, une enzyme retrouvée dans le foie et qui sert de mécanisme de défense contre les radicaux oxygénés (BASS et al., 2000) ou encore en utilisant un anticorps radiomarqué dirigé contre une molécule impliquée dans le phénomène à l'étude (ROSSIN et al., 2007). Les applications citées plus haut ne sont que quelques exemples parmi la multitude d'application de la TEP qui se développe de plus en plus chaque année puisque la TEP est une méthode non invasive qui permet de suivre dans le temps l'évolution d'un processus biologique.

5. PHOTOTHÉRAPIE

5.1 Principe général de la photothérapie

Les photosensibilisateurs sont des composés capables d'absorber la lumière à une longueur d'onde spécifique et de la transformer en une forme d'énergie utile (SHARMAN, 1999).

La thérapie photodynamique (TPD) dans l'éradication de tumeurs est basée sur le principe de l'activation d'un photosensibilisateur par une lumière de longueur d'onde précise après avoir administré ce dernier de manière systémique (BRASSEUR et al., 1996). La thérapie photodynamique a été suggérée comme traitement complémentaire aux thérapies conventionnelles dans l'éradication de tumeurs malignes (PAQUETTE et al., 1990)

La nature du photosensibilisateur, sa biodistribution ainsi que le temps d'irradiation après son administration sont tous des facteurs qui déterminent si la mort cellulaire se fera de manière directe par apoptose ou nécrose, ou encore de manière indirecte due aux dommages vasculaires subis par la tumeur (BRASSEUR et al., 1996).

5.2 Photosensibilisateurs

Le photosensibilisateur idéal devrait être chimiquement pur et de composition connue, avoir une toxicité minimale à la noirceur, être retenu préférentiellement dans les tissus ciblés et être rapidement excrété de l'organisme de manière à réduire le plus possible les effets secondaires liés à la photothérapie. Il doit également avoir une réactivité photochimique élevée et une longue vie à l'état triplet excité et produire efficacement l'oxygène singulet ainsi que d'autres espèces réactives pour être efficace

lors de la photothérapie. Finalement, il doit avoir une forte absorbance et un coefficient d'extinction molaire élevé à une longueur d'onde située entre 600 et 800nm là où la pénétration tissulaire est à son maximum (SHARMAN et al., 1999), (DETTY, GIBSON et WAGNER, 2004).

Le premier photosensibilisateur approuvé pour le traitement chez l'humain fut le Photofrin®, un dérivé d'hématoporphyrines qui est maintenant utilisé en clinique pour le traitement du cancer gastrique, cervical, du poumon, de l'œsophage et de la vessie. Les deux principaux désavantages du Photofrin sont la rétention du photosensibilisateur dans les tissus cutanés et ce jusqu'à dix semaines après l'injection, ainsi que la longueur d'onde à laquelle il absorbe la lumière qui ne permet pas une grande pénétration tissulaire (SHARMAN et al., 1999), (ALMEIDA et al., 2004).

Le plus gros problème avec les photosensibilisateurs utilisés en clinique présentement est leur manque de spécificité. En effet, le manque de spécificité implique une accumulation de photosensibilisateur dans les cellules saines ce qui entraîne des complications postthérapeutiques tel que des brûlures dues à une exposition au soleil. Ainsi, augmenter la spécificité des photosensibilisateurs permettrait de diminuer la concentration nécessaire à administrer aux patients (AKHLYNINA et al., 1995).

Les phtalocyanines sont des composés intéressants en tant que photosensibilisateurs à cause de leurs propriétés photophysique et photochimique plus efficaces que celles des photosensibilisateurs de première génération (ALLEN et al., 2002). Alors que le Photofrin absorbe la lumière à une longueur d'onde de 640nm, les phtalocyanines ont un pic d'absorption maximale entre 660-700nm, ce qui représente un

avantage puisque le sang est à son maximum de transparence à ces longueurs d'ondes (ALLEN, WEBER et VAN LIER, 1995) et que la lumière pénètre plus profondément dans les tissus à ces longueurs d'ondes (DOUGHERTY et al., 1998).

Finalement, la sulfonation d'un photosensibilisateur rend ce dernier soluble dans l'eau, et le choix de l'ion métallique incorporé dans le photosensibilisateur est très important puisqu'il maximise la génération d'espèces réactives comme l'oxygène singulet (GIROTTI, 1983), (CAUCHON et al., 2005), (DETTY, GIBSON et WAGNER, 2004).

5.3 Mécanismes d'action des photosensibilisateurs

La destruction de tumeurs par la TPD se fait via trois mécanismes distincts. Le premier est la mort cellulaire directe par apoptose ou nécrose, mécanisme qui est possible seulement lorsque le photosensibilisateur est incorporé dans la cellule. Le deuxième mécanisme consiste à attaquer le système vasculaire menant à la tumeur, ce qui mène à une thrombose ou une hémorragie. Sans son réseau sanguin, la tumeur est privée d'oxygène et de nutriments, menant éventuellement à sa destruction. Finalement, la TPD entraîne une réponse inflammatoire importante dans laquelle il y a un relâchement de cytokines et de protéines de réponse au stress qui peuvent mener à une augmentation de leucocytes contribuant ainsi à la destruction de la tumeur tout en stimulant le système immunitaire à reconnaître et à détruire les cellules tumorales, et même celles situées à une certaine distance de la tumeur (CASTANO, DEMIDOVA et HAMBLIN, 2005).

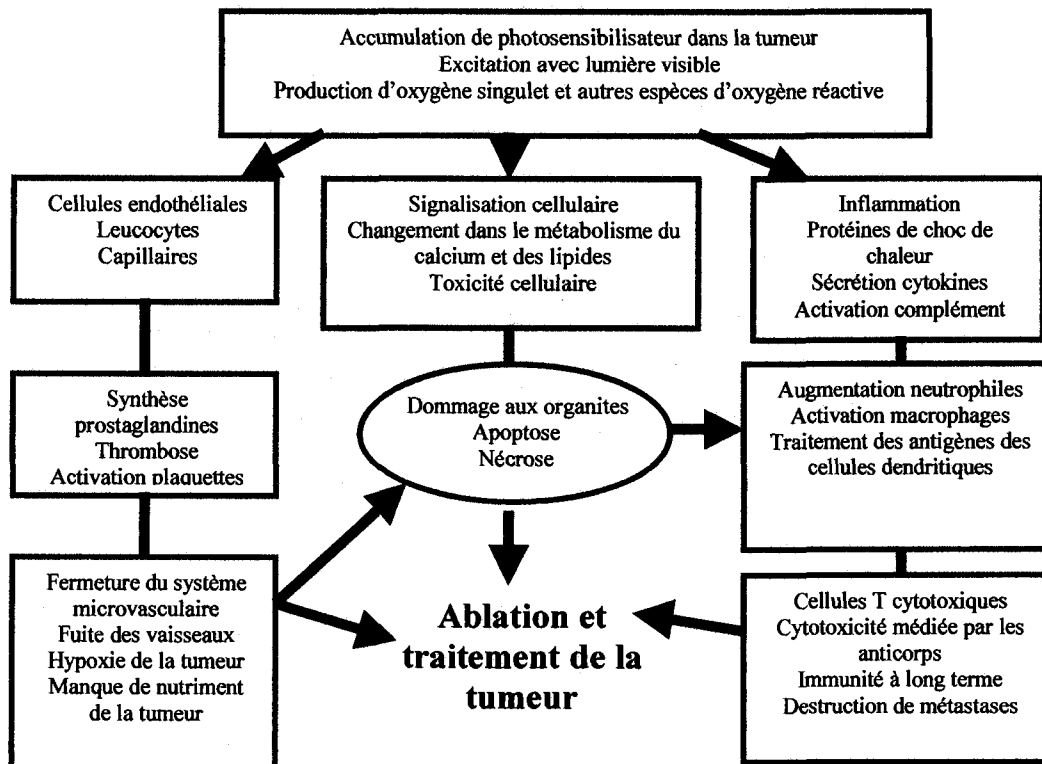


Figure 6- Voies métaboliques impliquées dans la destruction de tumeurs par la thérapie photodynamique.

Figure modifiée de CASTANO, DEMIDOVA et HAMBLIN, 2005.

Lors de son excitation, le photosensibilisateur passe d'un état stable (S_0) à un état singulet excité (S_1) qui est suivi par une conversion en état triplet (T_1). Le temps de vie de l'état triplet est plus long que celui de S_0 et S_1 , ce qui permet au photosensibilisateur en T_1 d'interagir avec les molécules qui l'entourent. L'état triplet excité peut provoquer deux types de réactions nommés mécanisme de type I et II (TAKEMURA et al., 1989).

Le mécanisme de type I implique une interaction directe entre le photosensibilisateur dans son état excité et un substrat qui peut être de nature biologique,

un solvant ou encore un autre sensibilisateur, de manière à produire des radicaux libres ou des radicaux ioniques. Ces radicaux libres sont des espèces très réactives qui peuvent interagir avec l'oxygène pour créer des anions superoxydes, des radicaux hydroxyles ou causer des dommages biologiques irréparables. Ces espèces produisent des dommages oxydatifs qui se transforment éventuellement en lésions biologiques (PLAETZER et al., 2003), (CASTANO, DEMIDOVA ET HAMBLIN, 2004).

Le mécanisme de type II nécessite un transfert d'énergie de la part du photosensibilisateur dans son état triplet excité à l'oxygène moléculaire dans son état normal, générant ainsi la forme singulet de l'oxygène. C'est cette espèce produite et très réactive qui interagira avec plusieurs substrats biologiques pour causer des dommages oxydatifs menant à la mort de la cellule. Lors de la TPD, il est possible, avec le même photosensibilisateur, de produire les deux types de mécanismes en même temps (OCHSNER, 1997), (FOOTE, 1991), (CASTANO, DEMIDOVA ET HAMBLIN, 2004).

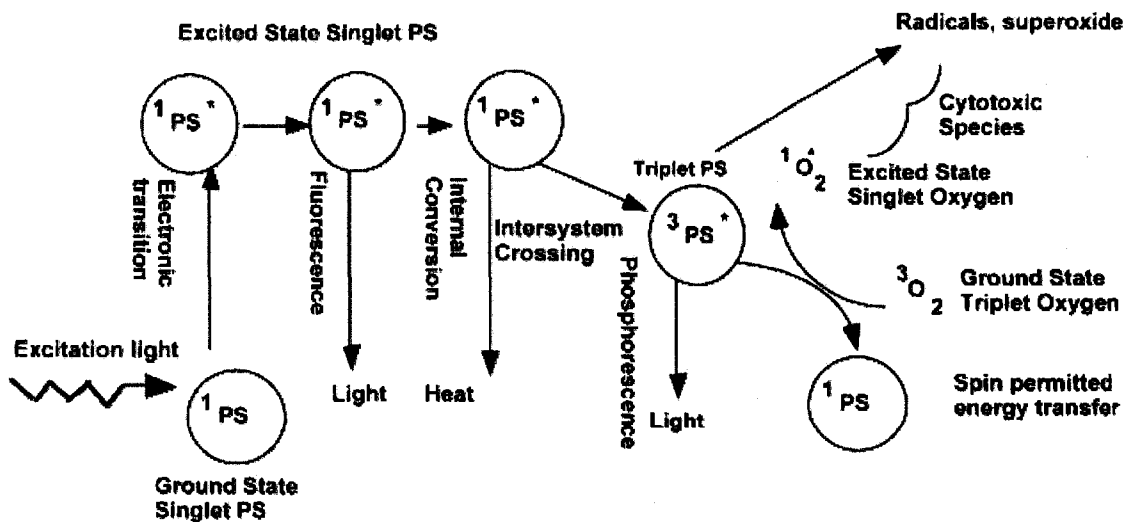


Figure 7- Principe de la thérapie photodynamique.

Figure reproduite de CASTANO, DEMIDOVA et HAMBLIN, 2004.

L'oxygène singulet représente 80% de toutes les espèces réactives générées lors de la photoactivation des porphyrines. L'oxygène singulet possède un temps de vie d'environ 200 ns et une circonférence d'action variant de 45 nm à 1µm. Donc, la localisation du photosensibilisateur est très importante puisque le champs d'action de cette espèce est très court (AKHLYNINA et al., 1995), (SHARMAN, ALLEN et VAN LIER, 2004).

C'est donc ce phénomène que l'on observe avec les phtalocyanines. Ces derniers possèdent deux électrons de spin opposés dans une orbital moléculaire de basse énergie (état singulet stable). Lorsqu'ils absorbent de la lumière, l'un de ces électrons est envoyé dans une orbital de haute énergie mais il conserve son spin (état singulet excité). Cet état ne dure que quelques nanosecondes puis il perd son énergie en émettant de la lumière à son tour ou par conversion interne en chaleur. L'état singulet excité peut mener à un croisement intersystème où le spin de l'électron excité s'inverse pour former l'état triplet excité qui possède une vie plus longue (quelques microsecondes). Cet état possède des spins d'électrons parallèles et c'est ce qui lui confère sa longue vie. En effet, une perte d'énergie par émission de lumière est impossible puisqu'il passerait directement d'un état triplet à un état singulet (CASTANO, DEMIDOVA et HAMBLIN, 2004).

Lorsque la lumière pénètre dans les tissus, elle est soit absorbée, soit dispersée selon sa longueur d'onde et le type de tissu. Une forte absorption peut être un problème lorsque la tumeur que l'on veut traiter est située plus en profondeur. Un autre problème rencontré est le «photobleaching» qui est en fait la destruction du photosensibilisateur lors de son exposition à la lumière. Ce phénomène a lieu lorsque les espèces réactives

produites interagissent avec les molécules du photosensibilisateur et détruisent ce dernier (CASTANO, DEMIDOVA et HAMBLIN, 2004). Le manque d'oxygénation de la tumeur peut également causer des problèmes lors de la TPD. Une façon de résoudre ce problème est de fractionner la dose de lumière en très petites périodes (20-50 secondes) pour permettre la ré-oxygénation de la tumeur entre chaque période d'illumination (ZILBERSTEIN et al., 1997).

Les cibles de la TPD sont les cellules tumorales, la microvascularisation normale et celle de la tumeur ainsi que le système immunitaire et inflammatoire de l'hôte (DOUGHERTY et al., 1998), (HENDERSON et DOUGHERTY, 1992). Plusieurs cibles sous-cellulaires peuvent être attaquées par le photosensibilisateur incluant les mitochondries, les lysosomes ainsi que les membranes plasmique et nucléaire. Les cibles de la TPD vont avoir un impact sur la façon dont la cellule mourra, c'est-à-dire soit par nécrose ou par apoptose (SHARMAN et al., 1999). Le stress oxydant induit par la TPD entraîne une augmentation de l'expression des gènes de réponse précoce tel que c-jun, c-fos, c-myc et egr-1 (LUNA, WONG et GOMER, 1994). De plus, la TPD peut moduler l'expression de l'interleukine-6 et -10 (IL-6 et IL-10) ainsi que du facteur de transcription NF- κ B (DOUGHERTY et al., 1998).

Il existe deux types de photosensibilisateurs, hydrophiles et hydrophobes. Les photosensibilisateurs hydrophiles sont généralement transportés par l'albumine sérique et tuent les cellules en endommageant les vaisseaux sanguins qui fournissent les nutriments à la tumeur alors que les photosensibilisateurs hydrophobes se localisent préférentiellement dans les lipoprotéines entraînant une accumulation intracellulaire du photosensibilisateur et une mort cellulaire directe lors de l'illumination (ROSENTHAL,

1991), (PLAETZER et al., 2003). La plupart des photosensibilisateurs utilisés en clinique sont excrétés par le foie dans la bile et se retrouve dans l'intestin où ils sont éliminés par les fèces (CASTANO, DEMIDOVA ET HAMBLIN, 2005).

OBJECTIFS DU PROJET

Les radiotraceurs utilisés en clinique présentement sont tous basés sur le principe du métabolisme cellulaire et non le type cellulaire. On peut donc visualiser le cancer de manière indirecte seulement via la différence de métabolisme des divers types cellulaires. En effet, c'est en partant du principe que les cellules tumorales ont un métabolisme plus élevé que les cellules normales qu'il est possible de visualiser le cancer par imagerie TEP or, il arrive parfois que certains types de cancer possèdent des cellules à métabolisme lent tel que le cancer de la prostate. Dans ces cas, il est donc impossible de visualiser le cancer avec la TEP. De plus, il est impossible avec ces radiotraceurs de déterminer l'agressivité d'une tumeur. Finalement, les traitements utilisés en clinique contre le cancer ne sont pas sélectifs ce qui entraîne beaucoup d'effets secondaires sévères. Donc, s'il était possible de lier le radioisotope ou la molécule utilisée pour le traitement avec un peptide qui cible spécifiquement certains types de cellules tel que les cellules du cancer du sein ou de la prostate, l'imagerie et le traitement du cancer seraient beaucoup plus efficaces et entraîneraient moins d'effets secondaires (ZHANG et al., 2004).

Nous avons donc deux objectifs dans cette étude. Le premier était de développer et d'évaluer un peptide spécifique à un marqueur du cancer du sein et de la prostate lié à un radioisotope en tant que radiotraceur dans l'imagerie TEP de ces deux formes de cancer. Notre deuxième objectif était d'évaluer le potentiel de ce même peptide lié à un photosensibilisateur dans le but de traiter ces mêmes formes de cancers par photothérapie sélective, minimisant ainsi les effets secondaires causés par cette thérapie.

Le récepteur à bombésin et son équivalent mammalien, le gastrin-releasing peptide receptor, est un récepteur qui est surexprimé chez plusieurs types de cellules cancéreuses dont les cancers du sein et de la prostate (OKARVI et AL-JAMMAZ, 2003), (APRIKIAN et al., 1998), (XIAO et al., 2001). De plus, il a été démontré que le sous-type GRPR est particulièrement surexprimé dans les cas de tumeurs agressives (BOLOGNA et al., 1989), (MAINA et al., 2005), (YHANG et al., 2006).

Le premier objectif de cette étude était d'évaluer le potentiel en tant que radiotracer pour l'imagerie TEP de deux analogues du bombésin marqués au Cu-64, le ^{64}Cu -DOTA-8-Aoc-BBN(7-14) NH_2 et le ^{64}Cu -DOTA-Aoc-[D-Tyr⁶βAla¹¹Thi¹³Nle¹⁴] BBN(6-14) NH_2 . La liaison du radioisotope à un analogue du bombésin permet de cibler précisément la tumeur qui surexprime ce type de récepteur en plus de donner un indice sur l'agressivité de la tumeur puisque ces analogues ciblent spécifiquement le sous-type de récepteur GRPR qui est souvent associé à une tumeur agressive.

Le deuxième objectif de cette étude était d'évaluer la faisabilité d'une photothérapie ciblée en utilisant ce même analogue du BBN/GRP, le 8-Aoc-BBN(7-14) NH_2 couplé à l'agent photosensibilisant AlPcS₄A₁.

1- Article 1 : « Suitability of ^{64}Cu -coupled bombesin analogues as breast and prostate cancer imaging agents. »

(soumis à *Nuclear Medicine and Biology*)

Cet article présente les résultats de l'étude portant sur l'évaluation du ^{64}Cu -DOTA-8-Aoc-BBN(7-14) NH_2 et du ^{64}Cu -DOTA-Aoc-[D-Tyr⁶βAla¹¹Thi¹³Nle¹⁴]BBN(6-14) NH_2 , deux analogues du bombesin en tant que nouveaux radiotraceurs pour la détection du cancer du sein et de la prostate à l'aide de l'imagerie TEP.

L'imagerie TEP permet de détecter de manière plus rapide et plus efficace le cancer et la récurrence de cancer ainsi que de déterminer la réponse au traitement. La TEP nécessite l'utilisation d'un radiotracer émetteur de positrons, et le plus couramment utilisé en clinique présentement est le ^{18}F FDG qui est un marqueur du métabolisme cellulaire et non des cellules cancéreuses elles-mêmes. Les nouveaux radiotraceurs évalués dans cet article possèdent l'avantage de cibler spécifiquement les récepteurs GRPR des cellules tumorales et pourraient donc s'avérer plus efficace dans la détection de ces deux types de cancer ainsi que de la détermination de l'agressivité de la tumeur.

Ces deux nouveaux radiotraceurs ont d'abord été évalués *in vitro* sur plusieurs lignées cellulaires tumorales murines et humaines dans le but de déterminer le meilleur modèle. Une évaluation *in vivo* de ces mêmes composés a ensuite été faite sur un modèle animal de souris avec lequel l'imagerie TEP et la biodistribution du produit dans le corps ont été déterminées.

Suitability of [⁶⁴Cu] coupled bombesin analogues as breast and prostate cancer imaging agents.

Abbreviated title: [⁶⁴Cu] bombesin analogues for cancer imaging.

C. Dubuc¹, M-C Tremblay¹, R. Langlois¹, E. Croteau¹, V. Dumulon¹, S. Authier¹, R. Lecomte¹, J.E. Van Lier¹, B. Guérin¹, F. Benard².

¹Department of Nuclear Medicine and Radiobiology (CIMS), Faculté de médecine, Université de Sherbrooke, 3001 12e avenue nord, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 5N4

²British Columbia Cancer Agency, 4th Floor, room 4113, 675 West 10th Avenue, Vancouver, BC, V5Z 1L3, Tel. 604-675-8206, Fax. 604-675-8218, fbenard@bccrc.ca

²To whom correspondence should be sent

Key words: bombesin, breast cancer, prostate cancer, peptide, PET imaging, biodistribution

Abstract

Introduction: Bombesin (BBN) is known to bind with high affinity to the gastrin-releasing peptide receptor (GRPR), a receptor overexpressed in many malignancies including breast and prostate cancer. The objective of this study was to evaluate two BBN analogues, [⁶⁴Cu]DOTA-8-Aoc-BBN(7-14)NH₂ and [⁶⁴Cu]DOTA-Aoc-[D-Tyr⁶Ala¹¹Thi¹³Nle¹⁴]BBN(6-14), as potential tracers for breast and prostate cancer imaging. **Methods:** Both analogues were tested *in vitro* by homologous competitive binding assays in six different cell lines: murine breast cancer cell lines MC7-L1 and MC4-L2, human breast cancer cell lines MCF-7, T47D and MDA-MB-231 and human prostate cancer cell line PC-3. GRPR expression was measured with [¹²⁵I]-[Tyr⁴]-BBN. *In vivo* experiments consisting of a PET scan followed by biodistribution were performed on MC7-L1, MC4-L2, MCF-7, T47D or PC-3 tumors implanted on mice. **Results:** The *in vitro* experiments with both analogues as competitors demonstrated the presence of GRPR in PC-3 and T47D cancer cell lines while minimal levels of GRPR were observed in the murine cell lines as well as the MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. The *in vivo* experiments showed that the uptake in pancreas dropped by 90% with co-injection of the unlabelled peptide, while no significant change was observed in tumor uptake. Significant tumor uptake of [⁶⁴Cu]Cl₂ and [⁶⁴Cu]acetate was noted. **Conclusion:** Murine breast cancer cell lines and MCF-7 are unsuitable to assess GRPR expression in tumors. Although both BBN analogues coupled with [⁶⁴Cu] depict specific receptor mediated uptake in the pancreas, tumor uptake is confounded by a background of [⁶⁴Cu] uptake not mediated by GRPR expression.

Introduction

Breast and prostate cancers are the two most frequently diagnosed malignancies [1]. Early detection is still the best way to insure survival in both types of cancer, but the radiotracers currently used in the clinical setting presently for cancer detection are not specific and may have a low sensitivity in some settings. For example, in prostate cancer, tumor cells often have a low cellular uptake of [^{18}F]FDG and therefore cannot be detected with this tracer [2]. Another problem with [^{18}F]FDG is that it cannot reliably distinguish between benign hyperplasia and cancer in the prostate [3]. This emphasizes the importance to develop new and more specific radiotracers for these cancers.

Bombesin (BBN) is a 14 amino acid peptide involved in gastric acid secretion and the release of various gastro-intestinal peptides and pancreatic enzymes [4,5]. BBN is also implicated in a wide range of biological functions such as cell growth in normal and tumor cells, thermoregulation, blood pressure, chemotaxis, memory retention, smooth muscle contraction and increase in satiety [5,6,7,8,9]. Some studies have also demonstrated that BBN acts as an autocrine growth factor and play a role in the transformation and progression of some cancers such as breast cancer [10,11]. BBN has also been shown to stimulate the secretion of metalloproteinase-9 (MMP-9), a protein associated with tumor invasion and aggressivity [12,13]. It has been known for many years now that bombesin receptor and its human counterpart gastrin-releasing peptide (GRP) receptor are overexpressed in some types of cancer such as breast and prostate cancer [14,15,16,17].

In 2003, Hoffman and al. [18] developed a new bombesin analog linked to an [¹¹¹In] radioisotope, the [¹¹¹In]8-Aoc-DOTA-BBN(7-14)NH₂. Our group used the same analog but we coupled it with a different radioisotope, the [⁶⁴Cu]. [⁶⁴Cu] has the double advantage of been both a positron (β⁺) and a β⁻ emitter and can be produced in a small biomedical cyclotron with a high specific activity so, the [⁶⁴Cu] decay characteristics makes it suitable for PET imaging as well as for therapy when administrated in sufficient dose to deliver therapeutic radiation to tumor cells. When targeted to tumor cells with a peptide like BBN, this approach could be highly specific to delivering radiation locally to tumor deposits [19]. We also tested another analogue, the [⁶⁴Cu]DOTA-Aoc-[D-Tyr⁶βAla¹¹Thi¹³Nle¹⁴]BBN(6-14) which is postulated to be more stable given the presence of unnatural amino acids [20]. We compared the two bombesin analogues both *in vitro* and *in vivo* in human and murine models of cancer in order to determine which one was superior for tumor detection.

Material and methods

Radiochemical synthesis of bombesin analogues

Preparation of Bombesin analogs:

Amide peptides (figure 1) were prepared by Fmoc solid phase peptide synthesis (SPPS) on a PioneerTM continuous flow peptide synthesis system with NovaSyn® TGR resin. A 2-fold excess of Fmoc protected amino acids over resin substitution rate were used for coupling. Fmoc protected amino acids were activated for coupling with an equimolar amount of HATU or TBTU, and 2 equivalents of DIEA. Fmoc deprotection was performed in 20% piperidine in DMF. After deprotection of the *N*-terminal amino acid,

Fmoc *N*-protected spacer and Cu-chelating unit were introduced on protected peptide-resin when requested. Peptide cleavage from the NovaSyn® TGR resin could be done using a TFA:water:TIPS (95%:2.5%:2.5%) solution; when DOTA was a part of the peptide, thioanisole was used instead of TIPS for peptide cleavage. Peptide purification was done by Flash chromatography on a Biotage SP4 system using a C₁₈column.

Radiolabelling with [⁶⁴Cu]

[⁶⁴Cu] has a mean positron energy similar to that of [¹⁸F] and a half-life of 12.8 h. [⁶⁴Cu], was produced at our Center at the Université de Sherbrooke on a TR-19 cyclotron (Advanced Cyclotron Systems, Richmond, BC, Canada) by the reaction ⁶⁴Ni(p,n)⁶⁴Cu using an enriched ⁶⁴Ni target electroplated on a solid rhodium disc (22 mm diameter, 1 mm thickness) [21]. ⁶⁴Ni was purchased from Isoflex (San Francisco, CA). [⁶⁴Cu]Cl₂ was recovered from the target material following the procedure of McCarthy *et al.* [22] and converted to [⁶⁴Cu]acetate by dissolving the [⁶⁴Cu]Cl₂ in 1 mL ammonium acetate (0.1 M; pH 5.5), followed by evaporation to dryness. DOTA-peptides were labelled with [⁶⁴Cu] following an approach proposed by Chen *et al.* [3]. [⁶⁴Cu]acetate was added to the peptide (1.2 µg/mCi of ⁶⁴Cu) in 0.1 N NaOAc buffer in presence of dihydroxybenzoic acid at 50 °C for 45 min. The solution was quenched by adding 5 µL of a 10 mmol/L EDTA solution. The [⁶⁴Cu]DOTA-peptide was purified using a Water 600 chromatography system with a C₁₈ Spherisorb ODS2 10µ column (10 × 250 mm). The gradient used was composed of 5% to 70% CH₃CN (0.1% TFA) in H₂O (0.1% TFA) in 40 min. The solvents were evaporated and the activity reconstituted in phosphate-buffered saline (PBS) and passed through a 0.22 µm Millipore filter into a sterile multidose vial for *in vitro* and *in vivo* animal experiments. The final product was considered carrier free and had a specific activity of around 500 Ci/mmol.

In vitro studies

In vitro binding affinity and specificity of bombesin analogues were investigated by competitive binding studies. Experiments were performed on murine breast cancer cells MC7-L1, MC4-L2 (generously provided by Dr. Molinolo from the Instituto de biologia y medicina experimental, Consejo Nacional de Investigaciones Cientificas y Técnicas en Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina), human breast cancer cells MCF-7, MDA-MB-231 and T47D and prostate cancer cell PC-3 (ATCC, Manassas, VA, USA). Assays were performed based on a protocol by Hoffman and al. Briefly, homologous competition assays were done in 24 well plates where 50 μ L of radiotracer (either [64 Cu]-8-Aoc-BBN(7-14)NH₂ produced in Sherbrooke or [125 I]-[Tyr⁴]BBN (Perkin-Elmer Life science Products, Boston, MA, USA)) diluted to obtain 20 000 cpm and 50 μ L of the appropriate dilution of cold bombesin (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) or one of the bombesin analogues (ranging from 10⁻⁶ to 10⁻¹⁴M) was added to 400 μ L of reaction buffer (RPMI, 0.2% Bovine serum albumin, 1% penicillin/Streptomycin and 2% HEPES (all products came from Wisent, St-Bruno, Qc, Canada)) for a final volume of 500 μ L. The cells were then incubated 40 min at 37°C with agitation. After incubation, cells were rinsed twice with PBS, trypsinized and counted in a Cobra- γ counter (Cobra II auto-gamma counter, Packard, MN, USA). All data were analysed using GraphPad Prism 4 program (Graph-Pad Software, San Diego, CA, USA).

In vivo studies

MC7-L1 and MC4-L2 cells were implanted on Balb/c mice while PC-3, MCF-7 or T47D were implanted on Balb/c nu/nu mice (all mice provided by Charles River in compliance with Canadian Council on Animal Care and in house Ethics Committee for Animal

Experiments). Cells (10^6) were implanted on the hips and tumors grown to a diameter of 5-7 mm (\approx 4 weeks after implantation). Animals were anesthetized with 2% isoflurane at 2 L/min of oxygen flow and then injected 10-400 μ Ci (5-10 μ Ci when only biodistribution was performed and 300-400 μ Ci for PET imaging) via the tail vein with one of the BBN analogues with or without a co-injection of cold bombesin (10 mg/kg). [64 Cu]Cl₂ and [64 Cu]acetate were injected in mice bearing PC-3 tumors. PET imaging was then performed on an avalanche photodiode animal PET scanner. Dynamic imaging was first performed for 50 min, 60 min after injection, followed by a static imaging of 20 min. The animals were sacrificed by CO₂ inhalation 30, 60 or 120 min following the injection, the organs were taken and immediately weighed and counted to evaluate the percentage injected dose accumulated per gram of tissue (%i.d./g tissue).

Results

Chemical and radiochemical synthesis

Identification of the peptides was established by measuring the respective mass/charge (m/z) values via MALDI mass spectrometry using Micromass ToF Spec 2F. The m/z value of the DOTA-Aoc-BBN(6-14) was 1666.94 and that of DOTA-Aoc-BBN(7-14) was 1467.73. 64 CuCl₂ was produced with a yield of 70 mCi / μ A hr/ μ g, with typical production batches in the order of 55-200 mCi (2000-7400 MBq) produced in about 2 hours. Retention time for DOTA-Aoc-BBN(6-14) was 13.6 min and for DOTA-Aoc-BBN(7-14) 13.3 min. Specific activity varied but was around 500 Ci/mmol.

In vitro receptor binding assay

The binding affinity to GRPR was evaluated for both bombesin analogues on four human cell lines: breast cancer cell lines MDA-MB-231, T47D and MCF-7 as well as prostate

cancer cell line PC-3 and two murine breast cancer cell lines: MC7-L1 and MC4-L2 with [^{125}I]-[Tyr 4]-BBN labelled as the competitor. For the T47D and PC-3 cell lines, typical sigmoid curves were obtained from the displacement of the radioactive compound as a function of increasing concentration of the cold BBN analogues or bombesin as can be seen in figure 2A and C. A K_i of 0.69 nM and 0.21 nM was calculated for T47D and for the PC-3 cell line respectively for the [^{64}Cu]DOTA-8-Aoc-BBN(7-14)NH $_2$. For [^{64}Cu]DOTA-Aoc-[D-Tyr 6 Ala 11 Thi 13 Nle 14]BBN(6-14)NH $_2$, a K_i of 231.60 nM and 16.21 nM was calculated for PC-3 and T47D respectively. The competition binding assays performed on the MDA-MB-231, MCF-7, MC7-L1 and MC4-L2 cell lines showed very low levels of GRP and BBN receptors with both bombesin analogues as can be seen from the sigmoid curves in figure 2A and B. No dissociation constant was calculated for those cell lines.

In vivo studies

Table 1, 2 and 3 show the biodistribution results for the two BBN analogues and the free [^{64}Cu]. Biodistributions were performed by injecting 5-10 μCi of one of the [^{64}Cu] coupled bombesin analogues. Considering a specific activity of 500 Ci/mmol, the animals received 0.2 pmol of radiotracer. Since uptake was maximum and stable between 60 and 120 min after injection of the radiotracer, only the results of 60 min after injection are shown in table 1, 2 and 3. All tumor types showed an uptake between 3 and 5% id/g of tissue for all BBN analogues. The animal groups used to test the murine cell lines each bore one MC7-L1 tumor on the left thigh and one MC4-L2 on the right thigh. For [^{64}Cu]DOTA-8-Aoc-BBN(7-14)NH $_2$, tumor uptake for these two tumor types were 2.62 \pm 0.85% and 2.41 \pm 1.33% respectively. When co-injected with cold bombesin, tumor uptake showed no significant difference with 2.91 \pm 0.97% and 3.05 \pm 1.76% respectively.

The human breast cancer cell line MCF-7 demonstrated low levels of GRPR expression *in vitro* (figure 2A) and when tested with [⁶⁴Cu]DOTA-8-Aoc-BBN(7-14)NH₂ and [⁶⁴Cu]DOTA-Aoc-[D-Tyr⁶βAla¹¹Thi¹³Nle¹⁴]-BBN(6-14)NH₂ without a co-injection we obtained moderate tumor uptake (4.16±1.68% and 3.34±2.6% respectively). With a co-injection of bombesin (4.37±1.1% and 4.08±2.07% respectively) there was no significant difference for both BBN analogues which supports the *in vitro* results. Since the murine breast cancer cell lines MC7-L1 and MC4-L2 also demonstrated low levels of GRPR expression, these tumors were first tested with the [⁶⁴Cu]DOTA-8-Aoc-BBN(7-14)NH₂ and the results obtained were similar to those of MCF-7 and therefore no further analysis was done on those cell lines. PC-3 and T47D were the only cell lines that demonstrated good GRPR expression *in vitro*. However, the results obtained *in vivo* were not as promising. Tumor uptake for PC-3 was 3.73±1.63% without co-injection and there was no significant difference with co-injection where tumor uptake was 4.97±1.93%. Due to difficulties in growing T47D tumors on mice, the [⁶⁴Cu]DOTA-8-Aoc-BBN(7-14)NH₂ was first tested without a co-injection and with a poor tumor uptake of 3.19±0.39% we decided not to pursue tests with this cell line. In order to confirm that the accumulation seen in the tumors and the different organs was due to the specificity of the BBN analogues for the GRPR, we injected one group of mice with [⁶⁴Cu]Cl₂ and one group with [⁶⁴Cu]acetate. The results obtained for [⁶⁴Cu]Cl₂ were 5.02±5.18% and that of [⁶⁴Cu]acetate 1.96±0.21%, demonstrating it was possible to accumulate [⁶⁴Cu] alone in tumors.

Pancreas uptake was also noted. In mice bearing PC-3 tumor, there was significant difference in uptake in the pancreas between the injection with and without a co-injection for both BBN analogues with 2.38±0.66% and 19.69±14.43% respectively, or between

the [^{64}Cu]DOTA-8-Aoc-BBN(7-14) NH_2 and the [^{64}Cu] Cl_2 and the [^{64}Cu]acetate (19.69 \pm 14.43%, 2.35 \pm 0.41% and 3.15 \pm 1.18% respectively). [^{64}Cu] Cl_2 and [^{64}Cu]acetate showed similar results for tumor and organ uptake to the ones of the bombesin analogues demonstrating a non specific accumulation in the organs and the tumor (table 3). Finally, results were very similar with [^{64}Cu]DOTA-Aoc-[D-Tyr⁶ β Ala¹¹ Thi¹³ Nle¹⁴]BBN(6-14) NH_2 (table 2).

Table 4 shows the target to reference tissue ratios, with blood as the reference tissue, for all the cell lines at different times and for both BBN analogues. No significant differences was observed between the ratios obtained with and without a co-injection of cold bombesin for either BBN analogues in any cell types. For the [^{64}Cu]DOTA-8-Aoc-BBN(7-14) NH_2 the highest ratios were those of PC-3 at 60 min post-injection with 3.24 \pm 1.57 without a co-injection and 3.73 \pm 1.18 with a co-injection. The highest ratios for MC7-L1 and MC4-L2 were at 60 min with 2.59 \pm 0.82 and 3.35 \pm 0.30 respectively and the lowest at 120 min with 1.26 \pm 1.44 and 1.35 \pm 1.63 respectively (all without a co-injection). For the [^{64}Cu]DOTA-Aoc-[D-Tyr⁶ β Ala¹¹ Thi¹³ Nle¹⁴]BBN(6-14) NH_2 all ratios were in the same range, between 0.83 and 1.68 and there was no significant differences between the results obtained with and without co-injection.

Small animal PET imaging

Figure 3 shows three PET images of Balb/c nu/nu mice bearing a PC-3 tumor on each thigh after injection of approximately 300 μCi of [^{64}Cu]DOTA-8-Aoc-BBN(7-14) NH_2 with or without a co-injection of cold bombesin or [^{64}Cu] Cl_2 . Data were collected using a static sequence at 180 min post injection, which was done over a period of 20 min. As shown in figure 3, tumors can be seen with [^{64}Cu]DOTA-8-Aoc-BBN(7-14) NH_2 but

also when a co-injection of bombesin is administered or when [^{64}Cu]Cl₂ is used, showing a definite uptake of free [^{64}Cu] by tumors and organs which is confirmed by biodistribution. The liver can also be clearly seen on those images. Images done with [^{64}Cu]DOTA-Aoc-[D-Tyr⁶ βAla¹¹ Thi¹³ Nle¹⁴]BBN(6-14)NH₂ gave very similar results (data not shown).

Discussion

Competition assays allowed us to determine which cell lines had potential for an animal model to assess GRPR expression and test BBN analogues. We first started with the murine cell lines MC7-L1 and MC4-L2. *In vitro* results did not show high levels of GRPR expression for those cell lines and for both bombesin analogues. *In vivo* tests performed in parallel to these experiments supported this hypothesis. Similar results were obtained with the MCF-7 cell line *in vitro* and *in vivo*. However, T47D and PC-3 cells demonstrated a good GRPR expression when tested *in vitro*, but *in vivo*, biodistribution showed a modest tumor accumulation. Considering the results already obtained with the other cell lines as well as the *in vitro* results, the MDA-MB-231 breast cancer cell line was not tested *in vivo*.

Both *in vitro* and *in vivo* results for the murine breast cancer cells showed that these cell lines do not express high levels of GRPR unlike T47D and PC-3 tumor cells which were found to express high levels of GRPR. This difference in GRPR is probably due to interspecies differences and proves that the murine model is not a good model to assess GRPR expression. *In vitro* results for human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 also showed low levels of GRPR expression. Both BBN analogues showed a definite uptake in pancreas which dropped by 90% in presence of cold bombesin, but

tumor uptake was not significantly higher than that of free ^{64}Cu which can enter tumors freely.

Moreover, there was no significant reduction in tumor uptake with co-injection of cold bombesin which leads us to believe that the accumulation in the tumor is not entirely due to the bombesin analogue but rather to ^{64}Cu alone. However, the significant difference of pancreas uptake between the ^{64}Cu alone and coupled to the BBN analogues proves that there is a certain specificity due to the GRPR since the pancreas is known to express a high level of GRPR. The tumor to blood ratios obtained were similar for all the cell lines tested which probably means that the radiotracer rather than the cell lines is the problem since the *in vitro* competition assays demonstrated the presence of GRPR on PC-3 and T47D cell lines. Specific receptor-mediated uptake should have been blocked with the injection of the unlabelled competitor. The fact that a relatively significant, non receptor-mediated uptake of ^{64}Cu was observed in all tumor types suggests that the mechanisms other than passive diffusion are responsible for the radioactivity noted in the tumors. Radioactive copper can bind to several enzymes and proteins, and our results show a significant tumor accumulation of ^{64}Cu acetate and ^{64}Cu Cl₂. Although the evidence is indirect, we believe that the peptides do not retain the ^{64}Cu *in vivo*. Peptides can be unstable *in vivo*, and are subject to the effects of peptidases. This is one plausible explanation, but we observed specific receptor mediated binding in the pancreas, suggesting that some radiolabeled peptide binding occurs. Another possibility is that DOTA might not chelate ^{64}Cu effectively *in vivo*. This is an alternative explanation for the high, non specific and non displaceable uptake which we observed in all tumor types *in vivo*. That also explains the poor uptake of ^{64}Cu in small animal PET images where tumors could hardly be differentiated from other organs. Indeed, if ^{64}Cu dissociated

from the BBN analog, the former would lose all specificity towards tumors and rapidly accumulate in the liver, the organ responsible for its excretion.

Conclusion

The results show that GRPR are expressed in human breast and prostate carcinoma cell lines. Murine breast carcinoma cell lines as well as human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 do not express high levels of GRPR as demonstrated by *in vitro* studies and are therefore not good models to study GRP ligands. *In vivo* studies demonstrated that [^{64}Cu] alone can interact with tumor cells as can be seen from the [^{64}Cu]Cl₂ and [^{64}Cu]acetate results. This demonstrates that it is very difficult to determine if the results obtained with the radioligand represent the receptor-ligand interaction or simply the [^{64}Cu] alone interacting with cell tumor. In light of these results, we are pursuing our efforts to develop a bombesin analog which is more resistant to peptidases, with alternative copper chelators better suited to retain [^{64}Cu].

References

- [1] XIAO D, CHINNAPPAN D, PESTELL R, ALBANESE C, WEBER HC. Bombesin regulates cyclin D1 expression through the early growth response protein Egr-1 in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2005;65(21):9934-42.
- [2] SCHEFFEL, POMPER. PET imaging of GRP receptor expression in prostate cancer. *J. Nucl. Med.* 2004;45(8):1277-1278.
- [3] CHEN X, PARK R, HOU Y, TOHME M, SHAHINIAN AH, BADING JR, CONTI PS. MicroPET and autoradiographic imaging of GRP receptor expression with ⁶⁴Cu-DOTA-[Lys3]bombesin in human prostate adenocarcinoma xenografts. *J. Nucl. Med.* 2004;45:1390-1397.
- [4] NELSON J, DONNELLY M, WALKER B, GRAY J, SHAW C, MURPHY RF. Bombesin stimulates proliferation of human breast cancer cells in culture. *Br. J. Cancer* 1991;63:933-936.
- [5] MANTEY S, FRUCHT H, COY DH, JENSEN RT. Characterization of bombesin receptors using a novel, potent, radiolabeled antagonist that distinguishes bombesin receptor subtypes. *Mol. Pharm.* 1993;43:762-774.
- [6] FATHI Z, CORJAY MH, SHAPIRA H, WADA E, BENYA R, JENSEN R, VIALLET J, SAUSVILLE EA, BATTEY JF. BRS-3 : A novel bombesin receptor subtype selectively expressed in testis and lung carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 1993;268(8):5979-5984.
- [7] SCOPINARO F, VARVARIGOU AD, USSOF W, DE VINCENTIS G, SOURLINGAS TG, EVANGELATOS GP, DATSTERIS J, ARCHIMANDRITIS SC. Technetium labeled bombesin-like peptide: preliminary report on breast cancer uptake in patients. *Cancer Biot. Radiopharm.* 2002;17(3), 327-335.
- [8] YEGEN BC. Bombesin-like peptides: candidates as diagnostic and therapeutic tools. *Curr. Pharm. Des.*, 2003;9 :1013-1022.
- [9] ROGERS BE, BIGOTT HM, McCARTHY W, MANNA DD, KIM J, SHARP TL, WELCH MJ. MicroPET imaging of a gastrin-releasing peptide receptor-positive tumor in a mouse model of human prostate cancer using a ⁶⁴Cu-labeled bombesin analogue. *Bioconjugate Chem.* 2003; 14:756-763.
- [10] YANO T, PINSKI J, SZEPESHAZI K, HALMOS G, RADULOVIC S, GROOT K, SCHALLY AV. Inhibitory effect of bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 and luteinizing hormone-releasing hormone antagonist SB-75 on the growth of MCF-7 MIII human breast cancer xenografts in athymic nude mice. *Cancer* 1994; 73 (4):1229-1238.
- [11] HALMOS G, WITTLIFF JL, SCHALLY AV. Characterization of bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in human breast cancer and their relationship to steroid receptor expression. *Cancer Research*, 1995;55:280-287.

- [12] FESTUCCIA C, ANGELUCCI A, GRAVINA GL, ELEUTERIO E, VICENTINI C, BOLOGNA M. Bombesin-dependent pro-MMP-9 activation in prostatic cancer cells requires β 1 integrin engagement. *Exp. Cell Res.* 2002;280:1-11.
- [13] ISHIMARU H, KAGEYAMAY, HAYASHI T, NEMOTO T, EISHI Y, KIHARA K. Expression of matrix metalloproteinase-9 and bombesin/gastrin-releasing peptide in human prostate cancers and their lymph node metastases. *Acta Oncologica* 2002; 41(3):289-296.
- [14] SMITH CJ, VOLKERT WA, HOFFMAN TJ. Gastrin releasing peptide (GRP) receptor targeted radiopharmaceuticals: a concise update. *Nucl. Med. Biol.*, 2003;30:861-868.
- [15] OKARVI SM, AL-JAMMAZ I. Synthesis, radiolabelling and biological characteristics of a bombesin peptide analog as a tumor imaging agent. *Anticancer Res.*, 2003;23:2745-2750.
- [16] NOCK B, NIKOLOPOULOU A, CHIOTELLIS E, LOUDOS G, MAINTAS D, REUBI JC, MAINA T. [^{99m}Tc]Demobesin 1, a novel potent bombesin analogue for GRP receptor-targeted tumor imaging. *Eur. J. Nucl. Med.* 2003;30:247-258.
- [17] SMITH CJ, SIECKMAN GL, OWEN NK, HAYES DL, MAZURU DG, KANNAN R, VOLKERT WA, HOFFMAN TJ. Radiochemical investigations of gastrin-releasing peptides receptor-specific [$^{99m}\text{Tc}(\text{X})(\text{CO})_3\text{-Dpr-Ser-Ser-Ser-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-(NH}_2\text{)}$] in PC-3 tumor-bearing, rodent models:syntheses, radiolabelling, and *in vitro/in vivo* studies where Drp = 2,3 diaminopropionic acid and X = H₂O or P(CH₂OH)₃. *Cancer Research* 2003; 63:4082-4088.
- [18] HOFFMAN TJ, HARIPRASAD G, SMITH CJ, SIECKMAN GL, HAYES DL, OWEN NK, VOLKERT WA. Novel series of ^{111}In -labeled bombesin analogs as potential radiopharmaceuticals for specific targeting of gastrin-releasing peptide receptors expressed on human prostate cancer cells. *J. Nucl. Med.* 2003;44:823-831.
- [19] SPRAGUE JE, PENG Y, SUN X, WEISMAN GR, WONG EH, ACHILEFU S, ANDERSON CJ. Preparation and biological evaluation of copper-64-labeled Tyr³-octreotate using a cross-bridged macrocyclic chelator. *Clin. Cancer Res.* 2004;10:8674-8682.
- [20] ZHANG H. Design, synthesis and pre-clinical evaluation of radiolabeled bombesin analogues for the diagnosis and targeted radiotherapy of bombesin-receptor expressing tumors. *Universität Basel.*(PhD. thesis) 2007.
- [21] ZEISLER SK, PAVAN RA, ORZECZOWSKI J, LANGLOIS R, RODRIGUE S, VAN LIER JE. Production of ^{64}Cu on the Sherbrooke TR-PET cyclotron. *J. Radioanal Nucl. Chem.* 2003; 257:175-177.

[22] McCARTHY DW, SHEFER RE, KLINKOWSTEIN RE, BASS LA, MARGENEAU WH, CUTLER CS. Efficient production of high specific activity ^{64}Cu using a biomedical cyclotron. *Nucl Med Biol* 1997; 24:35-43.

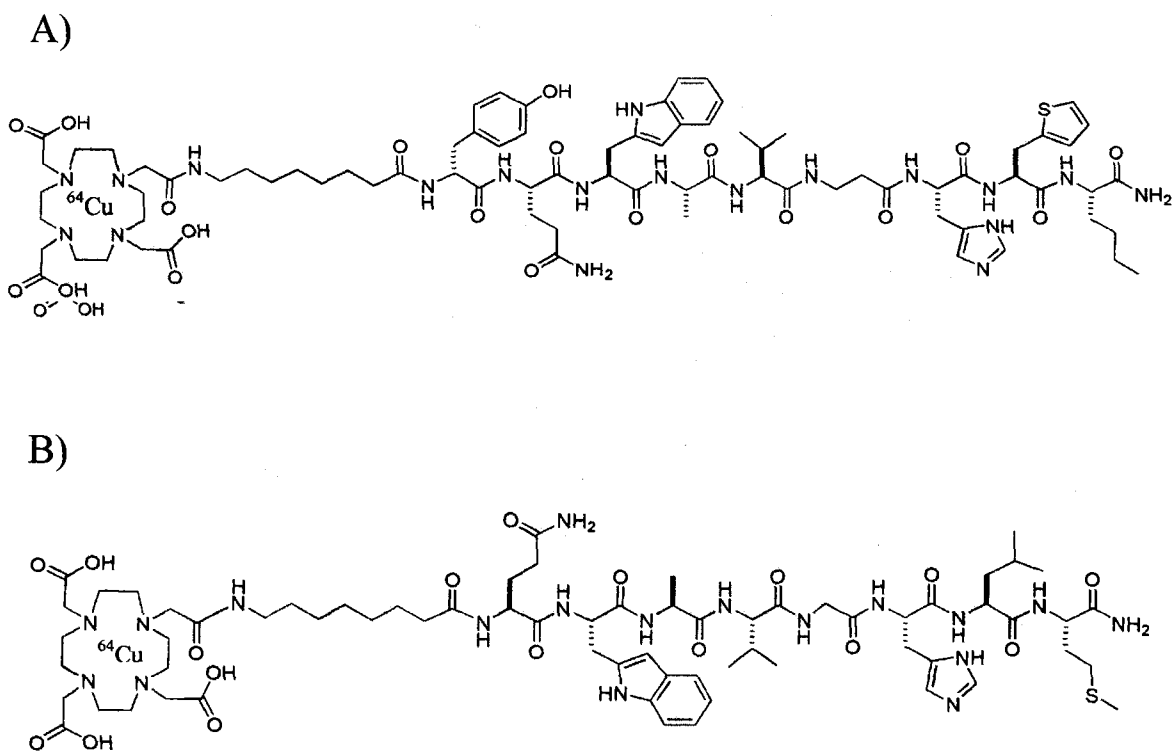
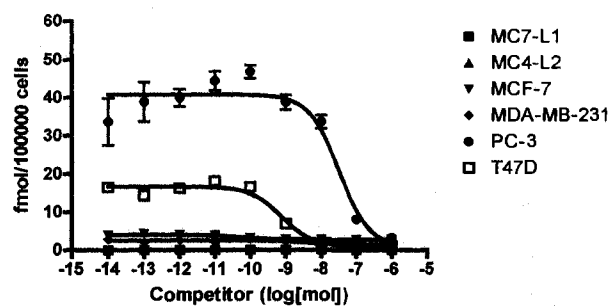
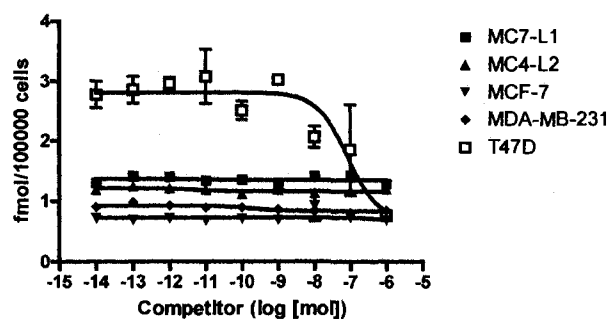


Figure 1: Schematic structures of BBN analogues A) ^{64}Cu -DOTA-Aoc-[D-Tyr⁶Ala¹¹Thi¹³Nle¹⁴]BBN(6-14)NH₂ and B) ^{64}Cu -DOTA-8-Aoc-BBN(7-14)NH₂

A)



B)



C)

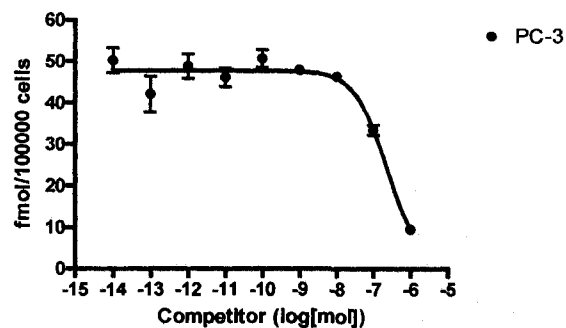


Figure 2: *In vitro* competition binding assays performed with ^{125}I [Tyr⁴]-bombesin and DOTA-8-Aoc-BBN(7-14)NH₂ as the competitor in A) and Cu-DOTA-Aoc-[D-Tyr⁶BAla¹¹Thi¹³Nle¹⁴]BBN(6-14)NH₂ in B) and C)

- A) MC7-L1, MC4-L2, MCF-7 and MDA-MB-231 showed low levels of GRPR. PC-3 and T47D showed high levels of GRPR with a K_i of 0.21 nM and 0.69 nM respectively.
 B) MC7-L1, MC4-L2 MCF-7 and MDA-MB-231 showed low levels of GRPR, T47D showed high levels of GRPR with a K_i of 16.21 nM.
 C) PC-3 showed high levels of GRPR with a K_i of 231.60 nM.

	⁶⁴ Cu-DOTA-8-Aoc-BBN(7-14)NH ₂									
	MCF-7		MCF-7 (with co-injection)		T47D		PC-3		PC-3 (with co-injection)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Blood	2.30	1.33	3.77	0.63	1.33	0.20	1.40	0.72	1.47	0.31
Plasma	3.26	1.90	4.99	1.63	1.77	0.33	2.01	1.19	1.73	0.63
Adrenal glands	4.33	2.22	10.03	0.55	0.01	0.00	8.79	5.79	5.46	1.22
Ovaries	6.36	4.30	12.86	4.03	0.02	0.01	---	---	---	---
Uterus	5.01	2.45	6.36	0.38	0.12	0.05	---	---	---	---
Testicules	---	---	---	---	---	---	0.75	0.23	0.82	0.41
Fat	2.96	2.03	5.78	1.57	1.67	0.05	1.59	0.49	1.65	0.54
Kidney	20.27	20.94	35.34	23.92	21.78	27.38	6.88	2.95	11.77	7.47
Spleen	4.28	1.43	6.23	1.65	3.16	0.58	2.72	1.34	2.18	0.71
Pancreas	11.16	3.64	6.50	1.46	2.87	0.28	19.69	14.43	2.38	0.66
Liver	29.16	11.41	52.39	4.53	22.78	7.05	21.82	11.13	27.16	6.64
Heart	3.43	1.71	6.14	1.13	2.30	0.15	3.10	1.66	2.89	0.63
Lungs	4.49	3.25	6.75	1.44	2.49	0.30	4.17	1.70	4.02	1.89
Tumor	4.16	1.68	4.37	1.01	3.19	0.39	3.73	1.63	4.97	1.93
Muscle	2.77	1.90	3.57	1.04	1.71	0.70	1.15	0.43	1.19	0.56
Bone	1.14	0.77	1.37	0.02	0.87	0.22	1.76	1.13	0.83	0.49
Brain	0.38	0.15	0.66	0.17	0.24	0.03	0.27	0.11	0.26	0.06

Table 1: Tissue biodistribution of ⁶⁴Cu-DOTA-8-Aoc-BBN(7-14)NH₂ radiotracer in Balb/c nu/nu mice bearing tumors on thighs, 60 min after injection of 5-10 μCi of radiotracer. For every group, n=3 except for PC-3 tumors without a co-injection of bombesin where n=6.

	⁶⁴ Cu-DOTA-Aoc-[D-Tyr ⁶ βAla ¹¹ Thi ¹³ Nle ¹⁴]BBN(6-14)NH ₂			
	PC-3		PC-3 (with co-injection)	
	Mean	SD	Mean	SD
Blood	2.20	0.91	2.15	0.31
Plasma	2.96	1.16	3.42	1.23
Adrenal glands	11.09	5.82	12.87	1.45
Testicles	0.77	0.13	0.97	0.11
Fat	1.60	0.71	2.13	0.05
Kidney	8.00	0.92	8.93	1.06
Spleen	2.82	0.26	2.86	0.18
Pancreas	24.20	5.05	3.08	0.82
Liver	17.69	1.24	24.37	0.6
Heart	2.35	0.12	3.34	0.069
Lungs	4.28	0.44	4.13	0.1
Tumor	2.30	0.41	2.25	0.23
Muscle	0.95	0.29	1.41	0.37
Bone	0.75	0.16	1.05	0.07
Brain	0.18	0.02	0.22	0

Table 2: Tissue biodistribution of ⁶⁴Cu-DOTA-Aoc-[D-Tyr⁶βAla¹¹Thi¹³Nle¹⁴]BBN(6-14)NH₂ in Balb/c nu/nu mice bearing tumors on thighs 60 min after injection of 5-10 μCi of radiotracer. For PC-3 tumors, n=6 and for PC-3 tumors with a co-injection of bombesin n=3.

	⁶⁴ CuCl ₂		⁶⁴ Cu acetate	
	Mean	SD	Mean	SD
Blood	3.23	1.97	1.95	0.65
Plasma	2.28	0.44	2.96	0.86
Adrenal glands	11.34	10.39	6.06	2.72
Testicules	0.73	0.30	2.63	3.16
Fat	0.76	0.51	1.62	1.06
Kidney	9.66	1.65	9.26	2.52
Spleen	6.40	4.96	3.25	0.83
Pancreas	2.35	0.41	3.15	1.18
Liver	29.98	4.69	31.56	11.33
Heart	3.52	1.35	2.84	0.43
Lungs	5.64	3.78	4.19	1.49
Tumor	5.02	5.18	1.96	0.21
Muscle	0.64	0.16	0.61	0.13
Bone	1.11	0.59	0.81	0.08
Brain	0.34	0.08	0.36	0.10

Table 3: Tissue biodistribution of radiotracer in Balb/c nu/nu mice bearing PC-3 tumors on thighs 60 min after injection of 5-10 μCi of free ⁶⁴Cu. n=3 for every group.

	⁶⁴ Cu-DOTA-8-Aoc-BBN(7-14)NH ₂				Free ⁶⁴ Cu				⁶⁴ Cu-DOTA-Aoc-[D-Tyr ⁶ Ala ¹¹ Thi ¹³ Nle ¹⁴]BBN(6-14)NH ₂			
	PC-3		T47D		CuCl ₂		Cu-acetate		PC-3		MCF-7	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
60min	3,24	1,57	3,37	1,55	1,49	0,96	1,85	1,03	0,83	0,78	1,68	0,46
60min co-inj	3,73	1,18	---	---	---	---	---	---	1,00	0,19	1,65	0,52

Table 4: Target to reference tissue ratio with blood as the reference tissue. n=3 for every group except PC-3 tumors without a co-injection of bombesin where n=6

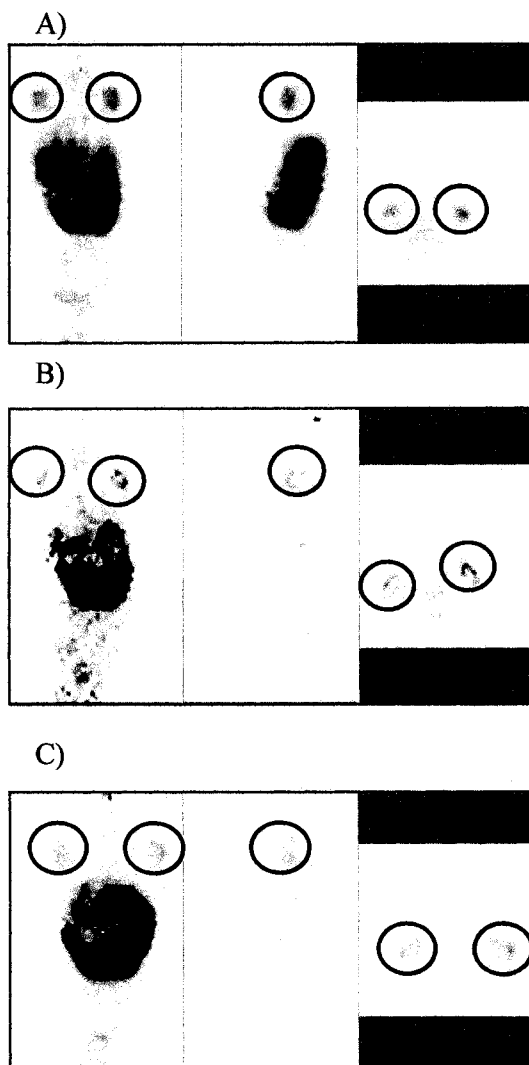


Figure 3: MicroPET images of Balbc nu/nu mice with PC-3 tumors on the thighs. From left to right, coronal, sagittal and transaxial view of A) ^{64}Cu -DOTA-8-Aoc-BBN(7-14) NH_2 (300 μCi), B) ^{64}Cu -DOTA-8-Aoc-BBN(7-14) NH_2 (300 μCi) with a co-injection of cold bombesin and C) $^{64}\text{CuCl}_2$ (300 μCi).

2- Article 2 : « Targeting gastrin-releasing peptide receptors of prostate cancer cells for photodynamic therapy with a phthalocyanine-bombesin conjugate »

(Soumis à *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*)

Cet article présente le même analogue du bombesin, soit le 8-Aoc-BBN(7-14)NH₂ mais cette fois couplé à un photosensibilisateur, le AlPcS₄A₁ dans le cadre de la photothérapie comme traitement contre le cancer.

Tous les traitements contre le cancer utilisés en clinique présentement sont soit invasifs ou entraînent de sérieux effets secondaires dus à leur manque de spécificité pour la tumeur. L'avantage de la photothérapie est qu'elle n'est ni invasive ni douloureuse. Il suffit simplement d'injecter le photosensibilisateur puis d'illuminer la tumeur à l'aide d'une source de lumière de longueur d'onde précise. La production d'espèces réactives tel que l'oxygène singulet qui s'en suit crée alors des dommages aux cellules de la tumeur. Comme il est possible d'illuminer seulement la tumeur, ce type de traitement entraîne moins d'effets secondaires. Toutefois, le photosensibilisateur seul possède quelques désavantages, le principal étant que même si l'on peut illuminer seulement la partie du corps désirée, le manque de spécificité du photosensibilisateur fait que ce dernier se retrouve dans le corps entier. Donc, le patient ne doit pas être exposé à la lumière pour la durée du traitement puisqu'une exposition à la lumière pourrait activer le photosensibilisateur dans le restant du corps et avoir de lourdes conséquences. Ainsi, en couplant le photosensibilisateur avec un analogue du bombesin, on obtient une spécificité grâce à ce dernier qui permet une concentration du photosensibilisateur au niveau de la tumeur et ainsi une diminution des effets secondaires et problèmes liés à la photothérapie.

Targeting gastrin-releasing peptide receptors of prostate cancer cells for photodynamic therapy with a phthalocyanine-bombesin conjugate

Céléna Dubuc^a, Réjean Langlois^a, François B  nard^a, Nicole Cauchon^a, Klaus Klarskov^b, Paul Tone^c and Johan E. van Lier^{a*}

^a*Department of nuclear medicine & radiobiology, and ^bDepartment of pharmacology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.*

^c*Department of medicine, Richmond University Medical Center, Staten Island, New York, USA.*

This is where the receipt/accepted dates will go; Received Month XX, 2000; Accepted Month XX, 2000 [BMCL RECEIPT]

Abstract—Sulfonated aluminum phthalocyanines (AIPcS) are potent photosensitizers for the photodynamic therapy (PDT) of cancer. In this study we evaluate the possibility to improve the efficacy of AIPcS-PDT for prostate cancer by targeting tetrasulfonated aluminum phthalocyanines (AIPcS₄) to the gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) through coupling to bombesin. A mono-carboxyl derivative of AIPcS₄ is attached to 8-Aoc-bombesin(7-14)NH₂ via an amide bridge to yield a bombesin-AIPcS₄ conjugate linked by a C-14 spacer chain. The conjugate is characterized by mass spectroscopy and shown to bind to the GRPR with a relative binding affinity (RBA) of 2.3, taking bombesin (RBA=100) as unity. The *in vitro* photodynamic efficacy of the conjugate against PC-3 human prostate cancer cells is improved by a factor 2.5 over the non-conjugated mono-carboxyl derivative of AIPcS₄. [BMCL ABSTRACT]   2000 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Sulfonated phthalocyanines; Bombesin conjugate; Photodynamic therapy.

*Corresponding author. Tel.: +1 819 564 5409; fax: +1 819 564 5442; e-mail: johan.e.vanlier@USherbrooke.ca

Photodynamic therapy (PDT) of cancer involves systemic administration of a photosensitizer followed by red-light activation of the diseased tissue. The activated photosensitizer interacts with ground state molecular oxygen to yield activated oxygen species (ROS) including singlet oxygen and different radical species. The resulting oxidative stress initiates a cascade of biochemical reactions resulting in cell death either by direct cell kill or by destruction of the micro vasculature of the tumor.ⁱ Selective retention of the photosensitizer in the tumor tissue combined with local illumination thus induces tumor regression without affecting the surrounding healthy tissues. Problems associated with photosensitizers presently approved for clinical use, such as Photofrin^{  }, include lack of chemical homogeneity, non-optimal light absorbing properties, prolonged retention in non-target tissues such as the skin and low selectivity for tumor tissues.ⁱⁱ Targeting photosensitizers as receptor mediated delivery systems has received increased

attention as a means to improve the outcome of PDT.^{iii,iv}

Sulfonated aluminum phthalocyanines (AlPcS) are water soluble, second generation photosensitizers that exhibit a strong absorption band between 660-700 nm with a peak at 680 nm, where tissue penetration is optimal. A mixture of mono- through tetra-sulfonated aluminum phthalocyanines has been used for over a decade for clinical PDT of cancer in Russia.^v The negatively-charged peripheral sulfonate groups assure water solubility, while the chelated central aluminum ion provides the complex with long-lived excited triplet states and good capacity to generate reactive singlet oxygen. We have previously shown that the tetrasulfonated analog, i.e. AlPcS₄, can be modified with a free C6-carboxyl sulfonamide side-chain (AlPcS₄A₁), allowing facile amide-coupling to free amine groups of proteins and peptides.^{vi,vii}

Bombesin, first discovered in skin of the frog *Bombina bombina*, and its human counterpart, gastrin-releasing peptide (GRP), are neurohormones with a wide range of biological effects such as stimulation of hormone secretion, memory retention, body temperature, cardiac output, blood pressure, control of food intake and changes in the dorsal vagal complex neuron.^{viii,ix} Bombesin also has been shown to affect tumor growth, cell proliferation and inflammation.^x In the case of prostate cancer, the receptor subtype GRPR is expressed early in tumor development and is correlated with tumor aggressiveness.^{xi} Therefore, GRPR is an obvious target for the development of novel agents for treatment and diagnosis of prostate cancer.^{xii} In this study we evaluate the potential to improve the efficacy of phthalocyanine-based PDT of prostate cancer by targeting the photosensitizer to GRPR using 8-Aoc-bombesin(7-14)NH₂, a potent bombesin analog previously developed by Hoffman.^{xiii}

The preparation of the bombesin-ALPcS₄ conjugate (Scheme 1) involves the following steps.^{xiv} A solution of 8-Aoc-bombesin(7-14)NH₂ (1.8 mg, 1 μmol) in 1 mL of sodium carbonate (0.2 M, pH 8.5) was added to the lyophilized, carbodiimide activated aluminum mono-(6-carboxypentylamino-sulfonyl)-trisulfophthalocyanine (ALPcS₄A₁) (5 μmol, 5 equiv) and stirred 1 h at 25°C while the pH was maintained at 8.5. The reaction mixture was kept in the dark at 4°C overnight. The bombesin-ALPcS₄ conjugate was purified by HPLC on a spherisorb ODS-2 column and characterized by MALDI-MS: C₈₉H₁₀₇O₂₃N₂₃S₅Al, found (M-H₂O): 2035.09; calcd.: 2034.62).

Competition assays for GRPR binding in PC-3 human prostate tumor cells against ¹²⁵I[Tyr⁴]-bombesin were performed as described in the literature.^{xv} Bombesin and 8-Aoc-bombesin(7-14)NH₂ show similar strong binding affinity for the GRPR with EC₅₀ of 2.58x10⁻¹⁰ M and 3.73x10⁻¹⁰ M, respectively. These values correspond to dissociation coefficients (K_d) of 2.17x10⁻¹⁰ and 3.33x10⁻¹⁰, respectively, and are in good agreement with reported literature values (1.10x10⁻¹⁰ and 4.90x10⁻¹⁰, respectively^{xvi,xvii}). In the same competition assay, binding affinity of the bombesin-ALPcS₄ conjugate also shows a characteristic sigmoid curve clearly indicating competition with ¹²⁵I[Tyr⁴]-bombesin, confirming retention of binding affinity for GRPR (Figure 1). However, the lower EC₅₀ of 2.94x10⁻⁸ M (K_d 2.9x10⁻⁸) indicates loss of specificity, which is reflected in a lower relative binding affinity (RBA=2.3), taking bombesin as unity (RBA=100).

Cellular phototoxicity was evaluated in PC-3 human prostate tumor cells.^{xviii} Cell metabolic activity curves after incubation with free and conjugated photosensitizer in

concentrations ranging from 1-20 μM as a function of red light fluences are presented in Figure 2. In all cases, conjugated bombesin- AlPcS_4 exhibits a slightly higher phototoxicity than the free AlPcS_4A_1 and a substantial higher phototoxicity when compared to the non-substituted AlPcS_4 . These differences in efficacy are more apparent when the LD_{50} and LC_{50} values, derived from the cell survival curves, are plotted against photosensitizer concentration and light dose, respectively (Figure 3). The latter reveal a significant 2-3 fold increase in photodynamic efficacy of conjugated over free AlPcS_4A_1 or AlPcS_4 at lower drug and/or light doses. At 3 J/cm^2 the conjugate requires 2.5 and >5 times less photosensitizer to inflict 50% cell inactivation as compared to the non-conjugated AlPcS_4A_1 and free AlPcS_4 , respectively. It should be noted that mono-carboxyl substituted AlPcS_4A_1 already exhibits significantly higher phototoxicity than the non substituted AlPcS_4 reflecting an increase in amphiphilic nature of the latter. Differences in the aggregation state of AlPcS_4 in the three photosensitizer preparations do not appear to play a role in the observed differences in phototoxicity.

As estimated from the ratios of the absorbance maxima at 635 nm (aggregate) and 680 nm (monomer), both the AlPcS_4 and AlPcS_4A_1 are largely monomeric in cell medium (74% and 68%, respectively), while for the bombesin conjugate the AlPcS_4 appears $>90\%$ aggregated. Thus the significantly higher phototoxicity of the latter below $2 \mu\text{M}$ suggests monomerization of the photosensitizer conjugate at the cellular level permitting internalization by GRPR. At higher drug and/or light doses the differences between the activities of the three photosensitizer preparations are less pronounced due to the higher level of phototoxicity under these extreme conditions.

In conclusion, linking AlPcS_4 to bombesin via a C-14 spacer chain yields a conjugate that

binds to GRPR with a relative binding affinity of 2.3 and that provides a modest gain in photodynamic potency against GRPR-rich prostate cancer cells. Further studies on the effect of the length of the spacer chain and polarity of the photosensitizer moiety on the GRPR binding affinity and cell penetrating capacity will be required in order to develop a bombesin-phthalocyanine conjugate with optimal properties for PDT of prostate cancer.

Acknowledgments

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, NTA-71855). F.B. and J.E.v.L. are members of the FRSQ-funded Centre de recherche clinique Étienne-Le Bel.

References and Notes

- ⁱ Henderson, B. W.; Dougherty, T. J. *Photochem. Photobiol.* **1992**, *55*, 145.
- ⁱⁱ Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Peng, Q. *J. Natl. Cancer Inst.* **1988**, *90*, 889.
- ⁱⁱⁱ Sharman, W. M.; van Lier, J. E.; Allen, C. M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 53.
- ^{iv} Hamblin, M. R.; Miller, J. L.; Ortel, B. *Photochem. Photobiol.* **2000**, *72*, 533.
- ^v Allen, C. M.; Sharman, W. M.; van Lier, J. E. *J. Porphyrines Phthalocyanines* **2001**, *5*, 161.
- ^{vi} Brasseur, N.; Langlois, R.; La Madeleine, C.; Ouellet, R.; van Lier, J. E. *Photochem. Photobiol.* **1999**, *69*, 345.
- ^{vii} Carcenac, M.; Larroque, C.; Langlois, R.; van Lier, J. E.; Artus, J. C.; Pelegrin, A.

Photochem. Photobiol. **1999**, *70*, 930.

^{viii} Moody, T. W.; Bertness, V.; Carney, V. *Peptides*, **1983**, *4*, 683.

^{ix} Kris, R. M.; Hazan, R.; Villines, J.; Moody, T. W.; Schlessinger, J. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 11215.

^x Yegen, B. G. *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 1013.

^{xi} Xiao, D.; Wang, J.; Hampton, L. L.; Weber, H. C. *Gene* **2001**, *264*, 95.

^{xii} Scheffel, U.; Pomper, M. G. *J. Nucl. Med.* **2004**, *45*, 1277.

^{xiii} Hoffman, T. J.; Gali, H.; Smith, C. J.; Sieckman, L. G.; Hayes, D. L.; Owen, N. K.; Volkert, W. A. *J. Nucl. Med.* **2003**, *44*, 823.

^{xiv} The HPLC system was equipped with a UV-vis detector set at 215 nm and 670 nm. The conjugate was eluted with a linear gradient from solvent system A/B (95:5) to A/B (3:7), over a period of 40 min at a flow rate of 2 ml/min (A = 0.1% TFA in H₂O and B = 0.05% TFA in CH₃CN). The MALDI-MS spectra were acquired in reflector mode using a ToF Spec 2E mass spectrometer (Micromass, Waters, Canada) with operating and pulse voltages set to 20kV and 2175 V, respectively. The sample was dissolved in water and diluted 100x in a saturated solution of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% aqueous acetonitrile, prior to application of 1 μL onto the sample probe. One point calibration was carried out with [Glu¹]-fibrinopeptide B (Oakville, ON, Canada).

^{xv} For competition assays^{xiii} cells were grown in Petri dishes to a confluence of about 70% and incubated at 37°C for 40min with 4.9mL of reaction medium (RPMI with 0.2% BSA, 1% penicillin/streptomycin, 2% HEPES), 50μL of a dilution of 20,000cpm of ¹²⁵I-bombesin (4,1x10⁻¹¹mol) (Perkin-Elmer) and 50μL of competitor solution (i.e. bombesin-ALPcS₄ conjugate, 8-Aoc-bombesin(7-14)NH₂ or bombesin) at increasing concentrations from 1x10⁻⁶ to 1x10⁻¹³mol. After incubation, cells were incubated with 1mL of 0.05% (w/v) trypsin and counted. A competition curve of the cpm bound as a

function of the concentration of cold competitor was made with GraphPad Prism computer-fitting program (Graph-Pad software, Inc.), providing EC_{50} values, dissociation coefficients (K_d) and relative binding affinities (RBA: Bombesin concentration required for 50% competition, divided by the competitor's concentration required for 50% competition, times 100).

^{xvi} Aprikian, A. G.; Han, K.; Chevalier, S.; Bazinet, M.; Viallet, J. *J. Mol. Endocrinol.* **1996**, *16*, 297.

^{xvii} Reile, H.; Armatis, P. E.; Schally, A. V. *Prostate* **1994**, *25*, 29.

^{xviii} Cell phototoxicity was estimated using a colorimetric MTT assay as described previously^{vi}. Briefly, 1×10^5 PC-3 cells per well in Ham's F12 growth medium were inoculated in 96 multiwell plates and incubated overnight at 37°C in the presence of 5% CO₂. The cells were rinsed with PBS and incubated with drug at concentrations ranging between 1.0 and 20 μM of AIPcS₄ (free or conjugated) in Ham's F12 1 % FBS for 24h at 37°C and 5% CO₂. After incubation, the cells were rinsed with PBS, refed with Ham's F12 medium and exposed to red light.^{vi} The cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ overnight before assessing cell viability. MTT in Ham's F12 growth medium was added to each well. After 4h, sodium dodecyl sulfate (SDS) was added. Plates were incubated overnight at 37°C and the absorbance was read the next day at 570nm with a microplate reader (BIO-TEK Instruments Inc., Winooski, VT). Average absorbance of blank wells is subtracted from the readings. The average absorbance of control cells incubated with Ham's F12 1% FBS, was taken as 100% cell survival. The light dose required to inactivate 50% of cells (LD₅₀) at a given drug dose and the photosensitizer concentration required to kill 50% of cells (LC₅₀) at a given light dose was extrapolated from survival curves.

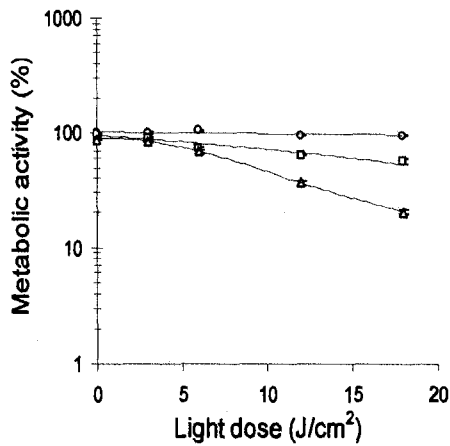
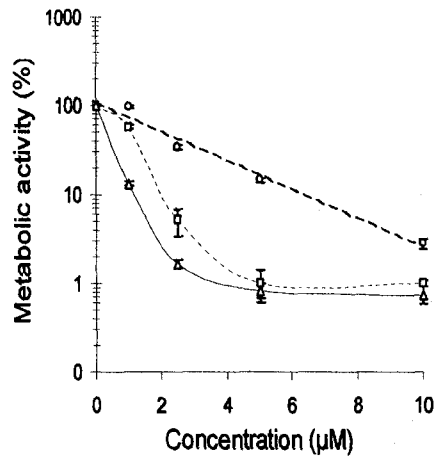
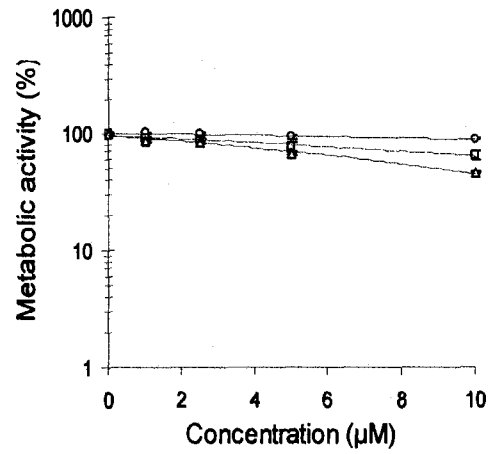


Figure 2. PC-3 cell inactivation after 24 h incubation with 1-20 μM of AlPcS₄ (o), AlPcS₄A₁ (\square) or bombesin-AlPcS₄ conjugate (Δ) following exposure to 3 J/cm^2 (top) or 18 J/cm^2 (middle) of red light, and after 24 h incubation with 1 μM of AlPcS₄ (o), AlPcS₄A₁ (\square) or bombesin-AlPcS₄ conjugate (Δ) following exposure to 3-18 J/cm^2 graded doses of red light (bottom).

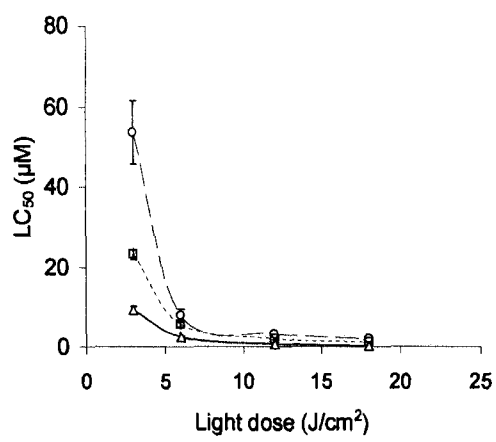
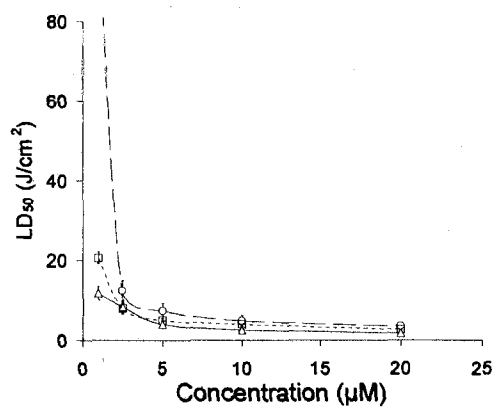


Figure 3. Light dose (top; LD₅₀ in J/cm²) and drug dose (lower; LC₅₀ in µM) required to induce 50% PC-3 cell inactivation after 24 h incubation with AIPcS₄ (o), AIPcS₄A₁ (□) or bombesin-AIPcS₄ conjugate (Δ).

6- DISCUSSION

L'imagerie TEP est un outil diagnostique précieux dans la détection du cancer et joue un rôle important dans l'avenir de la médecine nucléaire puisqu'une détection précoce du cancer ainsi qu'une précision accrue permettant de déterminer précisément le type de cancer ainsi que l'évolution de son développement sont des facteurs clés dans le traitement de cette terrible maladie. En effet, au cours des dernières années, plusieurs traitements contre le cancer ont été développés et plusieurs autres très prometteurs en sont au stade expérimental en ce moment et pourront sans aucun doute être disponible sous peu. La diversité des traitements permet de cibler de manière plus précise différents types de cancer et ainsi d'améliorer grandement les chances de survie tout en diminuant les effets secondaires souvent très importants engendrés par les traitements contre le cancer. Le choix du traitement dépend donc du type de tumeur, de ses caractéristiques spécifiques et de son agressivité. Par exemple, une tumeur exprimant des récepteurs à œstrogène répondra très bien à l'hormonothérapie. Par contre si la tumeur n'en expriment pas, l'hormonothérapie s'avèrera totalement inutile et un temps précieux sera perdu.

L'imagerie TEP permet déjà une détection précoce de l'étendu de tumeurs mais ne permet pas vraiment une bonne détermination de ces caractéristiques et de son agressivité. C'est pourquoi le développement de nouveaux radiotraceurs est très important. En effet, des radiotraceurs capables de cibler une ou des caractéristiques particulières de cancers, comme par exemple, des récepteurs surexprimés lors de cancers malins, pourraient grandement améliorer le diagnostique et ainsi permettre de choisir le traitement le plus approprié.

Le bombesin est l'un de ces récepteurs surexprimé lors de cancers agressifs tel que le cancer du sein et de la prostate. Dans le premier article, nous avons étudié deux analogues du bombesin couplés au Cu-64 en tant que radiotraceurs dans la détection de ces deux types de cancer.

Dans le premier article, nous avons découvert une disparité entre les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*. En effet, l'étude *in vitro* nous a permis de déterminer quelle lignée possédait le potentiel de modèle animal. C'est ainsi que nous avons découvert que les lignées murines de cancer mammaires MC7-L1 et MC4-L2 exprimaient peu de GRPR. Les lignées humaines de cancer mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 se sont également avérées exprimer peu de GRPR. Par contre la lignée humaine de cancer mammaire T47D et la lignée humaine de cancer de la prostate PC-3 exprimaient de haut taux de GRPR *in vitro* alors qu'*in vivo*, les résultats ne correspondaient pas à nos précédentes observations. En effet, selon le test statistique effectué (ANOVA), la différence entre le bruit de fond et la captation tumorale n'était pas significative. Plusieurs phénomènes peuvent expliquer ces résultats, à commencer par le fait que le bombesin et ses analogues peuvent se lier à plusieurs enzymes et protéines plasmatiques tel que les endopeptidases, ce qui les empêchent de s'accumuler dans la tumeur (DAVIS et al., 1992), (ROGERS et al., 1997). En effet, le bombesin et ses analogues sont facilement dégradés par les endopeptidases présentes dans le milieu (DAVIS et al., 1992), (ZHANG et al., 2007). De plus, il est possible que le cuivre inclus dans le DOTA ne reste pas lié au chélateur. Cette hypothèse est appuyée par le fait que nous avons observé une accumulation significative de $^{64}\text{CuCl}_2$ et de ^{64}Cu -acétate dans les tumeurs ce qui démontre bien que le Cu-64 libre peut entrer dans la tumeur par lui-même. Ce phénomène avait d'ailleurs été démontré en 2006 par le groupe de PENG (PENG et al.,

2006). De plus, nous n'avons noté aucune diminution significative entre l'injection de Cu-64 et l'injection de Cu-64 avec une co-injection de bombesin froid. Ces deux observations prises ensemble nous laissent donc croire que le Cu-64 ne reste pas lié à l'analogue du bombesin et qu'une partie de la captation tumorale est due au Cu-64 libre. Par contre, nous avons tout de même observé une diminution significative de la captation dans le pancréas, organe exprimant un très haut taux de GRPR, lors de co-injection de bombesin froid. Ceci nous indique donc qu'il y a quand même une certaine spécificité de l'analogue du bombesin et que même si le Cu-64 libre entre dans la tumeur, une certaine partie de la captation tumorale provient tout de même de la spécificité l'analogue du bombesin.

Une autre hypothèse pour expliquer les résultats obtenus est l'absence de récepteurs GRP sur les tumeurs implantées chez les souris. Par contre, ici encore, une expérience du groupe de Zhang en 2006 nous permet de conclure que le problème expérimenté *in vivo* émane des radiotraceurs et non des lignées cellulaires. En effet, en 2006, le groupe de Zhang (ZHANG et al., 2006) a réussi à obtenir de très bons résultats ainsi que des images de souris portant des tumeurs de type PC-3 avec un analogue du bombesin marqué au Fluor-18 très similaire à celui que nous avons utilisé. Or, le marquage d'une molécule au F-18 ne se fait pas de la même façon que le marquage au Cu-64. Lors du marquage d'une molécule avec le Cu-64, on lie ce dernier à la molécule (ou peptide) désirée via un chélateur alors que le F-18 lui, est situé directement sur le peptide. Il est donc beaucoup plus difficile de séparer le F-18 du peptide que le Cu-64. Ainsi, l'obtention de bons résultats avec cet analogue du bombesin marqué au F-18 en utilisant le même modèle animal et tumoral permet de croire que le problème est situé au niveau du radiotraceur et non des tumeurs.

De plus, nous avons observé que le ratio tumeur/sang est similaire pour toutes les lignées cellulaire peut importe les résultats obtenus *in vitro*. Nous en arrivons donc à la conclusion que l'analogue du bombesin et le Cu-64 ne reste pas ensemble. Deux hypothèses sont possibles : il est possible que des endopeptidases clivent le peptide et libère ainsi en quelque sorte le Cu-64 qui perd alors sa spécificité. Il est également probable que le DOTA ne soit pas un excellent chélateur pour le Cu-64 et qu'il ne retienne pas ce dernier. En effet, selon la structure du DOTA (présenté dans l'article 1), il est possible que le Cu-64 ne reste pas dans le chélateur à cause de la conformation du DOTA. Il a d'ailleurs été démontré que les chélateurs tel que le TETA, le DOTA et autres complexes tetraazamacrocycliques sont moins efficaces que les composés de types « cross-bridged » pour retenir des radiométaux puisque ces derniers encerclent entièrement le radioisotope (SUN and al., 2002), (BOSWELL and al., 2004). Un indice de la séparation du Cu-64 de l'analogue du bombesin *in vivo* pourrait être une accumulation du Cu-64 dans le foie puisque c'est via ce dernier que le cuivre est excrété. Or, nous avons effectivement noté une accumulation significative de Cu-64 dans le foie, ce qui peut laisser supposer que le Cu-64 et l'analogue du bombesin ne restent pas liés *in vivo*, mais ceci ne reste qu'une hypothèse. Puisque le problème des endopeptidases serait très difficile à résoudre, une première étape dans la résolution de ce problème serait donc d'utiliser un chélateur différent offrant une meilleure rétention du cuivre. En effet, plusieurs autres chélateurs tel que les cyclames et autres composés cycliques sont à l'étude depuis peu (SUN et al., 2002), (SHEN et al., 2006).

Le couplage d'un analogue du bombesin à un radioisotope pour l'imagerie TEP n'est pas la seule utilité de ces composés et c'est ce que démontre l'article 2. En effet, la liaison du BBN(7-14)NH₂ à un Pc permet d'obtenir un photosensibilisateur spécifique

aux cellules tumorales du cancer du sein et de la prostate utile dans la thérapie photodynamique. Nous avons démontré dans cet article que l'analogue du bombesin conservait ses propriétés lorsqu'il était lié au Pc et les essais de compétition ont prouvé que le photosensibilisateur obtenu se liait toujours, malgré une diminution de spécificité, au GRPR.

Ce nouveau photosensibilisateur possédait également une meilleure phototoxicité et démontrait une efficacité photodynamique deux à trois fois supérieure à celle du Pc seul, et ce particulièrement à des concentrations de photosensibilisateur ou de dose de lumière plus faible. C'est donc dire que l'analogue du bombesin couplé à l'AlPcS₄ A₁ est plus efficace que le Pc seul. Par contre, nous avons noté une différence de LD₅₀ non significative entre le Pc seul et le Pc lié à l'analogue du bombesin à des concentrations plus élevées (entre 5 et 10µM). Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats. En effet, la saturation des récepteurs GRP qui survient à concentration trop élevée et l'agrégation du photosensibilisateur sont les deux phénomènes les plus plausibles qui peuvent expliquer la diminution d'efficacité du Pc lié à l'analogue du bombesin à des concentrations plus élevées. La tendance des Pc à se lier aux protéines plasmatiques tel que l'albumine sérique bovine (BSA) est un phénomène connu qui entraîne, à concentration élevée, son agrégation et diminue l'efficacité de ce dernier (BRASSEUR et al., 1999). Dans le second article, nous nous sommes intéressés à cette question et nous avons découvert que le niveau d'agrégation du Pc n'a pas de lien avec son efficacité. En effet, le Pc lié à l'analogue du bombesin présentait le plus haut taux d'agrégation alors qu'il s'est avéré être le plus efficace. De même, AlPcS₄ présentait le plus bas niveau d'agrégation et pourtant il s'est avéré être le moins efficace. Toutefois, la saturation des

récepteurs à concentration plus élevée demeure un facteur important dans l'efficacité du ^{67}Cu lié à l'analogue du bombésin.

Ainsi, nous avons démontré dans ces deux articles que les analogues du bombésin permettent de cibler spécifiquement les cellules tumorales de cancer du sein et de la prostate lors de diagnostic par imagerie TEP ou de traitement par thérapie photodynamique, augmentant ainsi la précision du diagnostic ou du traitement tout en diminuant les effets secondaires et l'inconfort subi par le sujet.

7- PERSPECTIVES D'AVENIR

La liaison des analogues du bombesin avec le Cu-64 a donné des résultats plutôt modestes mais offre un excellent tremplin pour le futur. En effet, malgré des résultats *in vivo* plutôt décevants, les résultats *in vitro* ont démontrés qu'il est possible de lier des analogues du bombesin à un radioisotope tout en conservant les propriétés de cet analogue. Ce projet conserve donc un fort potentiel malgré tout et, étant donné la place importante qu'occupe l'imagerie TEP dans la détection du cancer et la détermination du type de traitement, la poursuite de ce projet est très intéressante. En effet, le choix du traitement est crucial dans la survie du patient et tout outils tel que la TEP susceptible de fournir des détails tel que l'agressivité de la tumeur ou encore l'expression de certains récepteurs ou non constitue un atout précieux. Le temps est également un facteur très important dans la lutte contre le cancer. La détection précoce de tumeurs tout comme l'application du traitement le plus adéquat dès le départ sont des atouts non négligeables et la TEP a le potentiel d'offrir ces options. Le développement de la TEP et de radiotraceurs sont donc très importants.

En plus des nombreux avantages de la TEP en tant qu'outils de détection, la combinaison d'un analogue du bombesin avec le Cu-64 permettrait de traiter les cancers du sein et de la prostate tout en les imageant grâce au type de radiations émises par le Cu-64.

À plus court terme, il serait intéressant d'utiliser un autre chélateur que le DOTA qui pourrait retenir le Cu-64 de façon plus efficace tel que le SarAr (DI BARTOLO et al., 2001) ou encore des complexes tetraazamacrocycliques plus puissant tels que le CB-TE2A et le CB-DO2A (BOSWELL et al., 2004). Bien sur, déterminer la cause exacte de

la libération du radioisotope du DOTA est la première étape dans la poursuite de ce projet. L'étude de la demi-vie biologique des radiotraceurs serait aussi très utile. De plus, la mise au point des paramètres de l'imagerie elle-même tel que le temps d'imagerie, la quantité de radiotraceur à injecter et le temps d'attente entre l'injection et l'imagerie reste à déterminer.

D'autre part, la liaison de l'analogue du bombesin au phtalocyanine ainsi que les résultats *in vitro* réalisés sont encourageants et des études *in vivo* chez un modèle animal pourraient être envisagées. Le problème majeur de la TPD à l'heure actuelle est surtout la pénétration de la lumière dans les tissus humains. En effet, plusieurs tissus sont situés trop profondément à l'intérieur du corps pour permettre une bonne pénétration de la lumière jusqu'au tissu voulu. C'est pourquoi, jusqu'ici, la TPD a été utilisée majoritairement pour traiter des maladies oculaires. La TPD n'est pas encore utilisée de routine dans le traitement du cancer mais une implémentation tel que le ciblage de récepteurs de cellules tumorales par le photosensibilisateur pourrait grandement favoriser son utilisation en oncologie. Cette forme de traitement comporte en effet plusieurs avantages non négligeables dont celui d'être non invasif et d'avoir des effets secondaires moins importants que plusieurs autres traitements utilisés présentement en oncologie.

Finalement, les résultats encourageants que nous avons obtenus de la liaison des analogues du bombesin à un radioisotope ainsi qu'à un photosensibilisateur illustrent bien le potentiel des peptides. En effet, un très grand nombre de peptides sont impliqués dans divers processus biologiques. On pourrait donc imaginer utiliser n'importe quel peptide de notre choix pour cibler le processus d'intérêt. L'imagerie TEP n'est pas non plus la seule forme d'imagerie qui pourrait être utilisée. Le bombesin présente en effet un intérêt

pour plusieurs autres techniques d'imagerie dans lesquelles il pourrait également être utilisé.

La fluorescence en est un exemple. En effet, l'imagerie par fluorescence fonctionne sensiblement de la même façon que la TEP mais au lieu de suivre l'accumulation un élément radioactif, on suit l'accumulation d'un élément émettant de la lumière. Ainsi, par exemple, en couplant un analogue du bombesin avec une molécule fluorescente tel que la GFP, il pourrait peut-être être possible de suivre cet analogue du bombesin et d'en apprendre davantage sur la localisation et le rôle du bombesin dans les cellules.

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est également une forme d'imagerie intéressante. Au cours des dernières années, l'IRM s'est beaucoup développée et permet maintenant d'obtenir des images de très bonne qualité. L'IRM est l'imagerie des protons de l'eau par un principe impliquant l'émission d'une fréquence pulsée et d'un champs magnétique dans le but de modifier le spin des électrons. Le gadolinium est un agent utilisé en IRM qui amplifie le signal et qui est déjà utilisé seul en clinique. Plusieurs groupes étudient déjà la possibilité de lier le gadolinium à d'autres molécules à l'aide du DOTA. On pourrait donc lier le gadolinium à un analogue du bombesin pour obtenir plus d'informations sur la localisation et le rôle précis du bombesin dans le développement de tumeurs.

8- CONCLUSION

L'imagerie TEP est le moyen le plus efficace de détecter plusieurs formes de cancer. Elle permet de déceler des tumeurs et des récurrences plus rapidement que n'importe quel autre test clinique en plus d'être non invasive. Par contre, le manque de spécificité des radiotraceurs présentement utilisés en clinique limite quelque fois l'efficacité que cette forme d'imagerie, d'où la nécessité de développer de nouveaux radiotraceurs plus performants. Nous avons évalué la possibilité d'utiliser le radioisotope Cu-64 couplé à un analogue du bombésin pour pouvoir cibler spécifiquement les récepteurs GRP qui sont surexprimés dans les cancers du sein et de la prostate. De plus, ces récepteurs fournissent un indice sur l'agressivité de la tumeur. Cette étude a donc été réalisée dans le but de pouvoir détecter le cancer de la prostate et obtenir une imagerie du cancer du sein plus précise incluant dans les deux cas une détermination qualitative de l'agressivité de la tumeur,

Deux analogues du bombésin, le 8-Aoc-BBN(7-14)NH₂ et le ⁶⁴Cu-DOTA-Aoc-[D-Tyr⁶βAla¹¹Thi¹³Nle¹⁴]BBN(6-14)NH₂ ont été évalués lors de ces expériences. Les résultats obtenus lors de l'évaluation *in vitro* du potentiel de ces analogues marqués au Cu-64 ont révélés une bonne spécificité envers les GRPR de plusieurs lignées de cellules tumorales. Ces résultats nous ont guidé vers les lignées les plus susceptibles de nous permettre d'établir et d'évaluer le potentiel de ces radiotraceurs *in vivo* dans un modèle animal murin. Un modèle de cancer du sein humain et un de cancer de la prostate ont donc été sélectionnés à partir des résultats obtenus *in vitro*. Toutefois, les résultats des modèles animaux ont été décevants par rapport à ceux obtenus *in vitro* avec les mêmes lignées cellulaires. Deux hypothèses peuvent expliquer les résultats obtenus *in vivo*. Tout d'abord, le bombésin est un neuropeptide qui a une très courte demi-vie biologique de 1-

2 min. (YEGEN, 2003) puisqu'il peut être lié à plusieurs protéines plasmatiques. De plus, la demi-vie du BBN(7-14) est également connue et est de 5min (YANG et al., 2006). Il est donc possible que les analogues que nous avons testés aient été dégradé avant d'atteindre la tumeur. La deuxième hypothèse est que le Cu-64 n'est pas demeuré lié au DOTA. En effet, lors de l'amorce de ce projet le DOTA était le chélateur le plus adéquat, mais sa configuration permet au Cu-64 de ressortir. D'autres hypothèses pourraient également expliquer la disparité entre les résultats *in vitro* et *in vivo*, mais la deuxième possibilité demeure cependant la plus probable car l'imagerie et les résultats de biodistribution démontrent clairement la présence de cuivre libre. En ce qui concerne la première hypothèse, l'un des deux analogues testés possédait des acides aminés synthétiques dans le but de contrer spécifiquement le problème de la dégradation *in vivo*, cette hypothèse est donc peu plausible.

En plus de l'imagerie TEP, nous avons étudié la possibilité d'utiliser l'un de ces analogues du bombesin, le 8-Aoc-BBN(7-14)NH₂, couplé à un photosensibilisateur, le AlPcS₄, dans le but d'évaluer son potentiel dans la thérapie photodynamique ciblée où l'analogue du bombesin permettrait de cibler spécifiquement les cancer du sein et de la prostate diminuant ainsi les effets secondaires nuisibles entraînés par la TPD. Les tests *in vitro* réalisés ont démontré le potentiel réel de l'analogue du bombesin lié à l'AlPcS₄ en tant que photosensibilisateur. En effet, l'étude *in vitro* démontre que l'analogue du bombesin conserve ses propriétés de liaison ainsi que sa spécificité envers les récepteurs GRP alors que AlPcS₄ conserve ses propriétés photosensibilisantes lorsqu'il est lié au 8-Aoc-BBN(7-14)NH₂. De plus, une augmentation de l'efficacité photodynamique a été notée lors de la liaison de l'AlPcS₄A₁ à l'analogue du bombesin. La conjugaison du Pc à l'analogue du bombesin permet également de diminuer la quantité de photosensibilisateur

requis pour la thérapie photodynamique. Le $\text{AlPcS}_4\text{A}_1\text{-8-aoc-BBN(7-14)NH}_2$ fait donc preuve d'un potentiel intéressant pour la thérapie photodynamique ciblée.

Ces deux études démontrent donc le potentiel des analogues du bombésin dans le diagnostic et le traitement du cancer du sein et de la prostate.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de recherche, le Pr. François Bénéard et le Dr. Johan Van Lier de m'avoir donné l'opportunité de poursuivre ce projet de recherche qui me tenait à cœur. J'ai eu la chance de voir naître ce projet et pouvoir suivre son développement du début à la fin ce qui a été pour moi une occasion unique de développer mon potentiel scientifique. Je tiens également à les remercier de m'avoir permis de participer à des congrès de grande envergure me permettant ainsi d'échanger avec de grands chercheurs et d'acquérir une vision plus globale de la recherche dans le monde et de l'immensité des possibilités.

Un merci particulier à toute l'équipe de chimistes qui a synthétisé les radiotraceurs, Réjean Langlois, Marie-Claude Tremblay, Merajuddin Khan et Brigitte Guérin ainsi que Serge Rodrigue au cyclotron. Merci aussi à tous les membres du département de médecine nucléaire et radiobiologie qui ont rendu cette expérience inoubliable spécialement ceux et celles qui m'ont beaucoup aidé dans ma maîtrise : Véronique Dumulon-Perreault et Simon Authier ainsi que Mélanie Archambault.

Je veux également remercier les membres du jury, Pr. François Bénéard, Dr. Johan Van Lier, Dr. Benoît Paquette et Dr. Fernand Jr. Gobeil d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Finalement je tiens à remercier ma famille qui m'a toujours supporté dans cette grande aventure.

Merci beaucoup à tous!
Céléna

BIBLIOGRAPHIE

ALLEN CM, WEBER JM et VAN LIER JE. Sulfophtalocyanines for photodynamic inactivation of viruses in blood products: effect of structural modification. *Photochem. Photobiol.* 1995;62(1):184-189.

ALLEN CM, LANGLOIS R, SHARMAN WM, LA MADELEINE C et VAN LIER JE. Photodynamic properties of amphiphilic derivatives of aluminum tetrasulfophtalocyanine. *Photochem. Photobiol.* 2002;76(2):208-216.

ALMEIDA RD, MANADAS BJ, CARVALHO AP et DUARTE CB. Intracellular signalling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochem. Biophys. Acta.* 2004;1704:59-86.

AKHLYNINA TV, ROSENKRANZ AA, JANS DA et SOBOLEV AS. Insulin mediated intracellular targeting enhances the photodynamic activity of chlorin e₆. *Cancer Res.* 1995;55:1014-1019.

ANASTASI A, ERSPAMER V, BUCCI M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians Bombina and Alytes. *Experientia* 1971;27:998-1000.

APRIKIAN AG, HAN K, CHEVALIER S, BAZINET M et VIALLET J. Bombesin specifically induces intracellular calcium mobilization via gastrin-releasing peptide receptors in human prostate cancer cells. *J. Mol. Endo.* 1996;16:297-306.

APRIKIAN AG, TREMBLAY L, HAN K et CHEVALIER S. Bombesin stimulates the motility of human prostate-carcinoma cells through tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and of integrin-associated proteins. *Int. J. Cancer*, 1997;72:498-504.

APRIKIAN AG, HAN K, GUY L, LANDRY F, BEGIN LR et CHEVALIER S. Neuroendocrine differentiation and the bombesin/gastrin-releasing peptide family of neuropeptides in the progression of human prostate cancer. *The Prostate*, suppl. 1998;8:52-61.

BAIDOO KE, LIN K-S, ZHAN Y, FINLEY P, SCHEFFEL U et WAGNER HN. Design, synthesis and initial evaluation of high-affinity technetium bombesin analogues. *Bioconj. Chem.*, 1998;9:218-225.

BAJO AM, SCHALLY AV, GROOT K et SZEPESHAZI K. Bombesin antagonists inhibit proangiogenic factors in human experimental breast cancers. *Br. J. Cancer*, 2004;90:245-252.

BASS LA, WANG M, WELCH MJ et ANDERSON C. *In vivo* transchelation of copper-64 from TETA-octreotide to superoxidedismutase in rat liver. *Bioconj. Chem.* 2000;11:527-532.

BENTZEN L, KEIDING S, NORDMARK M, FALBORG L, HANSEN SB, KELLER J, NIELSEN OS et OVERGAARD J. Tumour oxygenation assessed by 18F-fluoromisonidazole PET and polarographic needle electrodes in human soft tissue tumours. *Radioth. Oncol.* 2003;67(3):339-344.

BENYA RV, FATHI Z, KUSUI T, PRADHAN T, BATTEY JF et JENSEN RT. Gastrin-releasing peptide receptor-induced internalisation, down-regulation, desensitization, and growth : possible role for cyclic AMP. *Mol. Pharm.*, 1994; 46:235-245.

BISSIG K-D, HONER M, ZIMMERMANN K, SUMMER KH et SOLIOZ M. Whole animal copper flux assessed by positron emission tomography in the long-Evans cinnamon rat- a feasibility study. *BioMetals*, 2005;18:83-88.

BOLOGNA M, FESTUCCIA C, MUZI P, BIORDI L et CIOMEI M. Bombesin stimulates growth of human prostatic cells *in vitro*. *Cancer*. 1989; 63:1714-1720.

BOSWELL CA, SUN X, NIU W, WEISMAN GR, WONG EH, RHEINGOLD AL et ANDERSON C. Comparative *in vivo* stability of copper-64-labeled cross-bridged and conventional tetraazamacrocyclic complexes. *J. Med. Chem.* 2004;47:1465-1474.

BRASSEUR N, LEWIS K, ROUSSEAU J et VAN LIER JE. Measurement of tumor vascular damage in mice with ^{99m}Tc-MIBI following photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 1996;64(4):702-706.

BRASSEUR N, LANGLOIS R, LA MADELEINE C, OUELLET R et VAN LIER JE. Receptor-mediated targeting of phtalocyanines to macrophages via covalent coupling to native or maleylated bovine serum albumin. *Photochem. Photobiol.* 1999;69(3):345-352.

BREEMAN WA, DE JONG M, BERNARD BF, KWEKKEBOOMDJ, SRINIVASAN A, VAN DE PLUIJM ME, HOF LAND LJ, VISSER TJ et KRENNING E. Pre-clinical evaluation of [^{111}In -DTPA-Pro¹-Tyr⁴]bombesin, a new radioligand for bombesin-receptor scintigraphy. *Int. J. Nucl. Med.* 1999;83:657-663.

CAUCHON N, TIAN H, LANGLOIS R, LA MADELEINE C, MARTIN S, ALI H, HUNTING D et VAN LIER JE. Structure- photodynamic activity relationships of substituted zinc trisulfophtalocyanines. *Bioconj. Chem.* 2005;16:80-89.

CASTANO AP, DEMIDOVA TN et HAMBLIN MR. Mechanisms in photodynamic therapy:part one- photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagn. Photodyn. Therapy.* 2004;1:279-293.

CASTANO AP, DEMIDOVA TN et HAMBLIN MR. Mechanisms in photodynamic therapy:part three- photosensitizers pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor desruction. *Photodiagn. Photodyn. Therapy.* . 2005;2:91-106.

CHEN X, PARK R, HOU Y, YINGPING H, TOHME M, SHAHINIAN AH, BADING JR et CONTI PS. MicroPET and autoradiographic imaging of GRP receptor expression with ^{64}Cu -DOTA-[Lys3]bombesin in human prostate adenocarcinoma xenografts. *J. Nucl. Med.* 2004;45:1390-1397.

CHERRY SR et GAMBHIR SS. Use of positron emission tomography in animal research. *ILAR J.* 2001;42(3):219-232.

CROTEAU E, BENARD F, CADORETTE J, GAUTHIER ME, ALIAGA A,

BENTOURKIA M et LECOMTE R. Quantitative gated PET for the assessment of left ventricular function in small animals. *Journal of Nucl. Med.* 2003;44(10):1665-1661.

DAVIS TP, CROWELL S, TAYLOR J, CLARK DL, COY D, STALEY J et MOODY TW. Metabolic stability and tumor inhibition of bombesin/GRP receptor antagonists. *Peptides.* 1992; 13:401-407.

DEFRISE M et TREBOSEN R disponible à l'URL : <http://lpnhe-mip.in2p3.fr/polys/Rtrebossen.pdf>

DESCHODT-LANCKMAN M, ROBBERECHT P, DE NEEF P, LAMMENS M et CHRISTOPHE J. *In vitro* action of bombesin and bombesin-like peptides on amylase secretion, calcium efflux, and adenylate cyclase activity in the rat pancreas. *J. Clin. Invest.* 1976;58:891-898.

DETTY MR, GIBSON SL et WAGNER SJ. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J. Med. Chem.* 2004;47(16):3897-3915.

DI BARTOLO NM, SARGESON AM, DONLEVY TM et SMITH SV. Synthesis of a new cage ligand, SarAr, and its complexation with selected transition metal ions for potential use in radioimaging. *J. Chem. Soc.* 2001:2303-2309.

DOUGHERTY TJ, GOMER CJ, HENDERSON BW, JORI G, KESSEL D, KORBELIK M, MOAN J et PENG Q. Photodynamic therapy (review). *J. Natl. Cancer Inst.* 1998;90(12):889-905.

FATHI Z, CORJAY MH, SHAPIRA H, WADA E, BENYA R, JENSEN R, VIALLET J, SAUSVILLE EA et BATTEY JF. BRS-3 : A novel bombesin receptor subtype selectively expressed in testis and lung carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* ,1993;268(8):5979-5984.

FESTUCCIA C, FULVIO G, D'ASCENZO S, GIUNCIUGLIO D, ALBINI A et BOLOGNA M. *In vitro* regulation of pericellular proteolysis in prostatic tumor cells treated with bombesin. *Int. J. Cancer.* 1998;75:418-431.

FESTUCCIA C, ANGELUCCI A, GRAVINA GL, ELEUTERIO E, VICENTINI C et BOLOGNA M. Bombesin-dependent pro-MMP-9 activation in prostatic cancer cells requires β 1 integrin engagement. *Exp. Cell Res.* 2002;280:1-11.

FOOTE CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.* 1991;54(5):659

GIACCHETTI S, GAUVILLÉ C, DE CRÉMOUX P, BERTIN L, BERTHON P, ABITA JP, CUTTITA F et CALVO F. Characterization, in some human breast cancer cell lines, of gastrin-releasing peptide-like receptors which are absent in normal breast epithelial cells. *Int. J. Cancer,* 1990;46:293-298.

GIROTTI AW. Mechanism of photosensitization. *Photochem. Photobiol.* 1983;38:745-751.

HALMOS G, WITTLIFF JL et SCHALLY AV. Characterization of bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in human breast cancer and their relationship to steroid receptor expression. *Cancer Research*, 1995;55:280-287.

HENDERSON BW et DOUGHERTY TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.* 1992;55:145-157.

HEPPELER A, FROIDEVAUX S, EBERLE AN et MAECKE HR. Receptor targeting for tumor localisation and therapy with radiopeptides. *Curr. Med. Chem.* 2000;7:971-994.

HERGET T et ROZENGURT E. Bombesin endothelin and platelet-derived growth factor induce rapid translocation of the myristoylated alanine-rich C-kinase substrate in Swiss 3T3 cells. *Eur. J. Biochem.* 1994;225:539-548.

HOFFMAN TJ, QUINN TP et VOLKERT WA. Radiometallated receptor-avid peptide conjugates for specific *in vivo* targeting of cancer cells. *Nucl. Med. Biol.*, 2001;28:527-539.

HOFFMAN TJ, HARIPRASAD G, SMITH CJ, SIECKMAN GL, HAYES DL, OWEN NK et VOLKERT WA. Novel series of ¹¹¹In-labeled bombesin analogs as potential radiopharmaceuticals for specific targeting of gastrin-releasing peptide receptors expressed on human prostate cancer cells. *J. Nucl. Med.* 2003;44:823-831.

HUNT A, SCHONKNECHT P, HENZE M, SEIDL U, HABERKORN U et SCHRODER J. Reduced cerebral glucose metabolism in patients at risk for Alzheimer's disease. *Psy. Res.* 2007;155(2):147-154.

LECOMTE R, CADORETTE J, RODRIGUE S, LAPOINTE D, ROULEAU D, BENTOURKIA R, YAO R et MSAKI P. Initial results from the Sherbrooke avalanche photodiode positron tomograph. *IEEE Trans. Nucl. Sc.* 1996;43(3):1952-1957.

LUNA MC, WONG S et GOMER CJ. Photodynamic therapy mediated induction of early response genes. *Cancer Res.* 1994;53:1374-1380.

MAINA T, BERTHOLD AN, ZHANG H, NIKOLOPOULOU A, WASER B, REUBI JC et MAECKE HR. Species differences of bombesin analog interactions with GRPR define the choice of animal models in the development of GRPR-targeting drugs. *J. Nucl. Med.* 2005;46:823-830.

MANTEY S, FRUCHT H, COY DH et JENSEN RT. Characterization of bombesin receptors using a novel, potent, radiolabeled antagonist that distinguishes bombesin receptor subtypes. *Mol. Pharm.* 1993;43:762-774.

MANTEY SA, WEBER HC, SAINZ E, AKESON M, RYAN RR, PRADHAN TK, SEARLES RP, SPINDEL ER, BATTEY JF, COY DH et JENSEN RT. Discovery of a high affinity radioligand for the human orphan receptor, bombesin receptor subtype 3, which demonstrates that it has a unique pharmacology compared with other mammalian bombesin receptors. *J. Biol. Chem.* 1997;272(41):26062-26071.

MARKWALDER R et REUBI JC. Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate:relation to neoplastic transformation. *Cancer Research*, 1999;59:1152-1159.

MOODY TW, BERTNESS V et CARNEY DN. Bombesin-like peptides and receptors in human tumor cell lines. *Peptides*, 1983;4:683-686.

NAGALLA SR, BARRY BJ, CRESWICK KC, EDEN P, TAYLOR JT et SPINDEL ER. Cloning of a receptor for amphibian [Phe¹³]bombesin distinct from the receptor for gastrin-releasing peptide: Identification of a fourth bombesin receptor subtype (BB4). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995;92:6205-6209.

NELSON JB et CARDUCCI MA. Small bioactive peptides and cell surface peptidases in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Invest.* 2000;18(1):87-96.

OKARVI SM et AL-JAMMAZ I. Synthesis, radiolabelling and biological characteristics of a bombesin peptide analog as a tumor imaging agent. *Anticancer Res.*, 2003;23:2745-2750.

OCHSNER M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem. Photobiol. B: biol.* 1997;39:1-18.

PAQUETTE B, ALI H, LANGLOIS R et VAN LIER JE. Biological activities of phthalocyanines-XI. Phototoxicity of sulfonated aluminium naphthalocyanines towards V-79 chinese hamster cells. *Photochem. Photobiol.* 1990;51(3):313-317.

PENG F, LU X, JANISSE J, MUZIK O et SHIELDS AF. PET of human prostate cancer xenografts in mice with increased uptake of $^{64}\text{CuCl}_2$. *J. Nucl. Med.* 2006; 47: 1649-1652.

PLAETZER K, KIESSLICH T, VERWANGER T et KRAMMER B. The modes of cell death induced by PDT: an overview. *Med. Laser Appl.* 2003;18:7-19.

PLONOWSKI A, NAGY A, SCHALLY AV, SUN B, GROOT K, et HALMOS G. *In vivo* inhibition of PC-3 human androgen-independent prostate cancer by a targeted cytotoxic bombesin analogue, AN-215. *Int. J. Cancer*, 2000;88:652-657.

PRESTON SR, MILLER GV et PRIMROSE JN. Bombesin-like peptides and cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hem.*, 1996;23:225-238.

REUBI JC, GUGGER M et WASER B. Co-expressed peptide receptors in breast cancer as a molecular basis for *in vivo* multireceptor tumour targeting. *Eur. J. Nucl. Med.* 2002;29:855-862.

REUBI JC. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy.

Endo. Rev., 2003;24(4):389-427.

ROGERS BE, ROSENFELD ME, KHAZAELI MB, MIKHEEVA G, STACKHOUSE MA, LIU T, CURIEL DT et BUCHSBAUM DJ. Localization of iodine-125-mIP-Des-Met¹⁴-bombesin(7-13)NH₂ in ovarian carcinoma induced to express the gastrin releasing peptide receptor by adenoviral vector-mediated gene transfer. *J. Nucl. Med.* 1997; 38:1221-1229.

ROSENTHAL I. Phtalocyanines as photodynamic sensitizers. *Photochem. Photobiol.* 1991;53:859-870.

ROSSIN R, BERNDORFF D, FRIEBE M, DINKELBORG LM et WELCH MJ. Small animal PET of tumor angiogenesis using a (76)Br labeled human recombinant antibody fragment to the ED-B domain of fibronectin. *Journal of Nucl. Med.* 2007;48(7):1172-1179.

ROZENGURT E. Early signals in the mitogenic response. *Science*, 1986;234:161-166.

ROZENGURT E. Signal transduction pathways in the mitogenic response to G protein-coupled neuropeptide receptor agonists. *J. Cell. Phys.*, 1998;177:507-517.

SAHA GB. Fundamentals of nuclear pharmacy. (5e édition). Édition Springer, 2003, 382p.

SANTISKULVONG C, SINNETT-SMITH J et ROZENGURT E. EGF receptor function is required in late G1 for cell cycle progression induced by bombesin and bradykinin. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 2001;281:C886-C889.

SAURIN JC, NEMOZ-GAILLARD E, RATINEAU C, CHAYVIALLE JA et ABELLO J. Le neuropeptide bombésine module la prolifération et l'invasion tumorale. *Med/Science*, 2000;16 :929-935.

SCHUHMACHER J, ZHANG H, DOLL J, MACKE HR MATYS R, HAUSER H, HENZE M, HABERKORN U et 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;46:691-699.

SCOPINARO F, VARVARIGOU AD, USSOF W, DE VINCENTIS G, SOURLINGAS TG, EVANGELATOS GP, DATSTERIS J et ARCHIMANDRITIS SC. Technetium labeled bombesin-like peptide: preliminary report on breast cancer uptake in patients. *Cancer Biot. Radiopharm.* 2002;17(3), 327-335.

SHARMAN WM, ALLEN CM et VAN LIER JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *DDT* 1999;4(11):507-517.

SHARMAN WM, ALLEN CM et VAN LIER JE, Role of activate oxygen species in photodynamic therapy. *Met. Enzymol.* 2000;319:376-400.

SHEN X, BOSWELL CA, WONG EH, WEISMAN GR, ANDERSON CJ et TOMELLINI SA. Investigation of copper-azamacrocyclic complexes by high-performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 2006;20:37-47.

SMITH CJ, VOLKERT WA et HOFFMAN TJ. Gastrin releasing peptide (GRP) receptor targeted radiopharmaceuticals: a concise update. *Nucl. Med. Biol.*, 2003;30:861-868.

STANGELBERGER A, SCHALLY AV, LETSCH M, SZEPESHAZI K, NAGY A, HALMOS G, KANASHIRO CA, COREY E et VESSELA R. Targeted chemotherapy with cytotoxic bombesin analogue AN-215 inhibits growth of experimental human prostate cancers. *Int. J. Cancer*, 2006;118:222-229.

SUN X, WUEST M, WEISMAN GR, WONG EH, REED DP, BOSWELL CA, MOTEKAITIS R, MARTELL AE, WELCH MJ et ANDERSON CA. Radiolabeling and *in vivo* behavior of copper-64-labeled cross-bridged cyclam ligands. *J. Med. Chem.* 2002;45:469-477.

TAKEMURA T, OHTA N, NAKAJIMA S et SAKATA I. Critical importance of the triplet lifetime of the photosensitizer in photodynamic therapy of tumors. *Photochem Photobiol.* 1989;50:339-344.

VAN DE WIELE C, DUMONT F, VANDEN BROECKE, OOSTERLINCK W, COCQUYT V, SERREYN, PEERS S, THORNBACK J, SLEGGERS G et DIERCKX RA. Technetium-99m RP527, a GRP analogue for visualisation of GRP receptor-expressing malignancies: a feasibility study. *Eur. J. Nucl. Med.* 2000;27:1694-1699.

XIAO D, WANG J, HAMPTON LL et WEBER C. The human gastrin-releasing peptide receptor gene structure, its tissue expression and promoter. *Gene* 2001;264:95-103.

XIAO D, CHINNAPPAN D, PESTELL R, ALBANESE C et WEBER HC. Bombesin regulates cyclin D1 expression through the early growth response protein Egr-1 in prostate cancer cells. *Cancer Res.*, 2005;65(21):9934-42.

YANG Y-S, ZHANG X, XIONG Z et CHEN X. Comparative *in vitro* and *in vivo* evaluation of two ⁶⁴Cu-labeled bombesin analogs in a mouse model of human prostate adenocarcinoma. *Nucl. Med. Biol.* 2006;33:371-380.

YEGEN BC. Bombesin-like peptides: candidates as diagnostic and therapeutic tools. *Curr. Pharm. Des.*, 2003;9 :1013-1022.

ZHANG H, CHEN J, WALDHERR C, HINNI K, WASER B, REUBI JC et MAECKE HR. Synthesis and evaluation of bombesin derivatives on the basis of pan-bombesin peptides labeled with indium-111, lutetium-1777, and yttrium-90 for targeting bombesin receptor-expressing tumors. *Cancer Res.* 2004;64:6707-6715.

ZHANG X, CAI W, CAO F, SCHREIBMANN E, WU Y, WU JC, XING L ET CHEN X. ¹⁸F-labeled bombesin analogs for targeting GRP receptor-expressing prostate cancer. *J Nucl Med* 2006;47:492-501.

ZHANG H. Design, synthesis and pre-clinical evaluation of radiolabeled bombesin analogues for the diagnosis and targeted radiotherapy of bombesin-receptor expressing tumors. *Universität Basel*. (PhD. thesis) 2007.

ZILBERSTEIN J, BROMBERG A, FRANTZ A, ROSENBAACH-BELKIN V, KRITZMANN A, PFEFERMANN R, SALOMON Y et SHERZ A. Light-dependant oxygen consumption in bacterio-chorophyll-serine-treated melanoma tumors: on-line determination using a tissue-inserted oxygen microsensor. *Photochem. Photobiol.* 1997;65:1012-1019.

ANNEXES

ANNEXE 1

Protocole expérimental d'essai de compétition de liaison d'analogues du bombesin à des récepteurs de cancer du sein et de la prostate

- 1- Mettre dans des plaques de 24 puits les cellules tumorales de la lignée désirée (50 000 cellules par puits) et laisser croître jusqu'à environ 70-80% de confluence.
- 2- Aspirer le milieu de culture cellulaire et le remplacer par 400µl de milieu de réaction (RPMI à pH 7.4 contenant 4,8 mg/ml d'HEPES (10 ml pour 500ml de milieu), 0.1µg/ml de Pénicilline/Streptavidine (5ml pour 500ml de milieu) et 2mg/ml de BSA (1g pour 500ml de milieu)).
- 3- Ajouter 50µl d'analogue du bombesin marqué au Cu-64 ou de bombesin marqué au I-125 (ayant une dilution donnant 20 000 cpm, 370 Bq) et 50µl de bombesin ou d'analogue du bombesin non radioactif ayant une concentration variant de 1×10^{-13} M à 1×10^{-6} M et compléter les volumes des pétris pour avoir un volume final de 500µl si nécessaire dans chacun des puits.
- 4- Incuber les cellules à 37°C pendant 40min avec agitation.
- 5- Aspirer le milieu de réaction.
- 6- Laver les cellules 2X avec du PBS.
- 7- Mettre 500µl de trypsine dans les puits.
- 8- Récolter les cellules et placer le contenu de chaque puits dans un tube et compter dans le compteur gamma « Cobra γ -counter ».
- 9- Analyser les résultats obtenus avec GraphPRISM.

ANNEXE 2

Protocole expérimental d'imagerie TEP tumorale au Cu-64 et de biodistribution

- 1- Peser et identifier l'animal, mesurer les tumeurs.
- 2- Anesthésier l'animal sous isoflurane (2.0%, oxygène 1.5L/min).
- 3- Installer une canule dans la veine caudale.
- 4- Préparer une seringue de 300 μ Ci pour de l'imagerie ou 10 μ Ci pour une biodistribution d'analogue du bombesin marqué au Cu-64 en complétant le volume à 0.2ml avec de la saline.
- 5- Injecter l'animal.
- 6- Faire un flush de 0.1ml.
- 7- Réveiller et garder l'animal dans sa cage derrière le mur de plomb pendant le temps requis.
- 8- Installer l'animal anesthésié (isoflurane) sur le ventre tête première et positionner le laser sur les tumeurs.
- 9- Faire une image statique de type corps entier pendant 1h.
- 10- Sacrifier l'animal sous anesthésie par inhalation de CO₂.
- 11- Procéder à la biodistribution.
- 12- Quantifier la radioactivité (en % de dose injectée accumulé par gramme de tissu) contenue dans chacun des organes obtenus de la biodistribution.

Annexe 3

Cette partie de l'annexe présente les résultats de biodistribution pour les lignées MC7-L1 et MC4-L2 pour le ^{64}Cu -DOTA-8-Aoc-BBN(7-14) NH_2 qui étaient mentionnés dans l'article #1 mais dont le tableau n'était pas présenté. On peut voir que ces résultats sont très similaires à ceux présentés dans l'article avec une accumulation importante dans le foie et une accumulation dans les tumeurs qui ressemble beaucoup à celle des autres lignées qui varient entre 1.0 et 5.0%.

	MC7-L1		MC4-L2*		MC7-L1 with co- injection		MC4-L2* with co- injection	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Blood	6.28	3.18	---	---	5.47	3.98	---	---
Plasma	2.37	0.70	---	---	2.84	1.20	---	---
Adrenal glands	4.27	1.11	---	---	3.37	0.97	---	---
Ovaries	3.62	1.13	---	---	6.23	5.52	---	---
Uterus	3.41	1.03	---	---	4.64	2.24	---	---
Testicules	---	---	---	---	---	---	---	---
Fat	0.77	0.56	---	---	1.24	0.83	---	---
Kidney	5.98	1.18	---	---	7.58	3.81	---	---
Spleen	3.06	1.04	---	---	2.75	0.77	---	---
Pancreas	---	---	---	---	---	---	---	---
Liver	16.50	4.53	---	---	16.86	3.81	---	---
Heart	3.24	0.92	---	---	2.68	0.82	---	---
Lungs	4.87	2.03	---	---	4.87	1.30	---	---
Tumor	2.62	0.85	2.41	1.33	2.91	0.97	3.05	1.76
Muscle	0.76	0.52	---	---	0.76	0.30	---	---
Bone	1.26	0.59	---	---	1.31	0.51	---	---
Brain	0.32	0.15	---	---	0.25	0.10	---	---

*Each group of animal bore one MC7-L1 tumor on the left thigh and one MC4-L2 tumor on the right thigh

Cette partie de l'annexe présente les résultats de biodistribution pour la lignée MCF-7 pour le ^{64}Cu -DOTA-Aoc-[D-Tyr 6 Ala 11 Thi 13 Nle 14]BBN(6-14)NH $_2$ qui étaient mentionnés dans l'article #1 mais dont le tableau n'était pas présenté. On peut voir que ces résultats sont très similaires à ceux présentés dans l'article ainsi que ceux de l'autre analogue de BBN avec une accumulation importante dans le foie où le cuivre est métabolisé et dans le pancréas où l'on retrouve une expression élevée de GRPR. Les tumeurs démontrent également une accumulation similaire aux autres lignées ainsi qu'à l'autre analogue de BBN.

	MCF-7		MCF-7 (with co-injection)	
	Mean	SD	Mean	SD
Blood	2,23	2,27	2,58	1,2
Plasma	3,08	2,76	4,57	2,34
Adrenal glands	5,84	4,41	5,23	1,1
Ovaries	6,48	7,29	5,23	1,87
Uterus	3,98	2,88	3,23	0,95
Testicules	---	---	---	---
Fat	1,65	1,19	3,21	0,81
Kidney	12,82	8,93	13,84	6,75
Spleen	4,17	3,14	4,4	1,19
Pancreas	19,72	11,93	4,08	0,57
Liver	24,76	15,84	35,04	8,72
Heart	4,13	4,32	3,98	0,75
Lungs	6,21	6,43	5,73	1,77
Tumor	3,34	0,33	4,08	1,47
Muscle	1,42	1,05	2,47	1,7
Bone	0,98	1,10	0,67	0,15
Brain	0,37	0,32	0,29	0,1

Annexe 4

Cette annexe présente les résultats des ratios calculés à partir des biodistributions (non inclus dans l'article #1) et qui donnent une autre vision de l'accumulation des analogues de BBN dans les tumeurs.

(tumeur/sang) (^{64}Cu -DOTA-8-Aoc-BBN(7-14) NH_2)

	MC7-L1		MC4-L2		PC-3		T47D		MCF-7		CuCl ₂		Cu acetate	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
30min	2,10	0,19	2,92	0,40	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
60min	2,59	0,82	3,35	0,30	3,24	1,57	3,37	1,55	2,26	0,66	1,49	0,96	1,85	1,03
60min co-inj	1,90	0,73	2,39	0,84	3,73	1,18	----	----	----	----	----	----	----	----
120min	1,26	1,44	1,35	1,63	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
120min co-inj	1,48	1,45	1,64	1,60	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

(tumeur/muscle) (^{64}Cu -DOTA-8-Aoc-BBN(7-14) NH_2)

	MC7-L1		MC4-L2		PC-3		T47D		MCF-7		CuCl ₂		Cu acetate	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
30min	3,63	0,29	5,13	1,35	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
60min	5,75	1,52	7,62	1,44	3,42	1,34	3,69	2,67	1,94	0,50	8,43	7,99	2,95	0,30
60min co-inj	3,33	1,40	4,28	2,12	7,37	6,00	----	----	----	----	----	----	----	----
120min	4,68	1,71	4,77	2,02	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
120min co-inj	3,99	1,67	3,47	1,82	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

(tumeur/sang) (^{64}Cu -DOTA-Aoc-[D-Tyr⁶βAla¹¹Thi¹³Nle¹⁴]BBN(6-14) NH_2)

	PC-3		MCF-7	
	Mean	SD	Mean	SD
60min	0,83	0,78	1,68	0,46
60min co-inj	1,00	0,19	1,65	0,52

(tumeur/muscle) (^{64}Cu -DOTA-Aoc-[D-Tyr⁶βAla¹¹Thi¹³Nle¹⁴]BBN(6-14) NH_2)

	PC-3		MCF-7	
	Mean	SD	Mean	SD
60min	2,56	0,72	2,29	0,61
60min co-inj	1,64	0,43	1,88	0,59