

UNIVERSITÉ DE NANTES

Faculté de Médecine

Année 2009

Ciblage du syndecan-1 dans un modèle de
xénogreffe de carcinome mammaire en
radioimmunothérapie
alpha et bêta

THÈSE DE DOCTORAT

École Doctorale Biologie-Santé

Discipline : Biologie-Médecine-Santé

Spécialité : Cancérologie-Immunothérapie

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Anne-Lise Ruellan

Le 13 novembre 2009, devant le jury ci-dessous

Président

Rapporteurs
Montpellier

M. POUGET Jean-Pierre, CR IRSN,

Mme GRUAZ Anne, DR INSERM, Paris

Examineurs

Directeur de thèse : M. DAVODEAU François, CR INSERM, Nantes

Co-directeur de thèse : M. BARBET Jacques, DR CNRS, Nantes

Liste des abréviations

Table des illustrations

INTRODUCTION	1
A. Les différentes lignes de traitements contre le cancer	3
I. Les traitements classiques	3
II. L'hormonothérapie	4
III. Les thérapies vectorisées	5
1. L'immunothérapie	5
2. Les traitements anti-angiogéniques	8
3. La radiothérapie vectorisée	9
a. La radiothérapie vectorisée utilisant des peptides	9
b. La radioimmunothérapie (RIT)	10
B. La radioimmunothérapie	11
I. Principe	11
II. Pré-requis	12
III. Comparaison RIT bêta (β) et alpha (α)	13
1. Energie cinétique et parcours moyen tissulaire	13
2. Notion de transfert d'énergie linéique (TEL)	14
3. L'efficacité biologique relative (EBR)	15
4. Etudes comparatives	16
5. Les indications thérapeutiques de la RIT	17
IV. Les aspects radiobiologiques de la RIT	18
1. Les effets cellulaires	18
2. Les effets tissulaires	20
V. Les radioéléments β	21
1. Les principaux émetteurs de particules β	21
a. L'iode 131 (^{131}I)	22
b. L'yttrium 90 (^{90}Y)	22
c. Le cuivre 67 (^{67}Cu)	22
2. Les cibles thérapeutiques des rayonnements β	25
a. RIT β et traitement des tumeurs hématologiques	25
b. RIT β des tumeurs solides et de la maladie résiduelle	28
VI. Les radioéléments α	31
1. Le bismuth 213 (^{213}Bi)	31
a. Propriétés physico-chimiques	31
b. Les essais thérapeutiques	32
2. L'actinium 225 (^{225}Ac)	34
a. Propriétés physico-chimiques	34
b. Les essais thérapeutiques	35
3. L'astate 211 (^{211}At)	36
a. Propriétés physico-chimiques	36
b. Les essais thérapeutiques	37
VII. Les différentes formes et caractéristiques des vecteurs utilisés en RIT	41
1. Les différents vecteurs	41
a. Les immunoglobulines	41
b. Les fragments d'anticorps	44
2. Les caractéristiques du vecteur	46
a. La spécificité du vecteur	46
b. L'affinité du vecteur	46
c. L'immunogénicité du vecteur	47
VIII. Facteurs limitant l'efficacité de la RIT	49
1. La toxicité aux tissus sains	49
2. La stabilité du radioimmunoconjugué <i>in vivo</i>	49
a. Couplage des isotopes halogénés	50
b. Couplage des isotopes métalliques	51
3. Le micro-environnement tumoral	53
a. L'hétérogénéité vasculaire	53

b. L'hypoxie tumorale	54
IX. L'optimisation des protocoles de RIT	55
1. Augmenter le degré de fixation du radioimmunoconjugué	56
a. Le fractionnement de la dose administrée	56
b. Le pré-ciblage des tumeurs	57
c. Augmenter la perméabilité vasculaire et le flux sanguin intratumoral	59
d. L'hyperthermie	61
2. Diminuer l'irradiation non spécifique	62
a. L'administration intra-cavitaire	62
b. Diminuer la toxicité rénale	63
3. Bilan pré-thérapeutique par imagerie et dosimétrie	65
4. Les associations thérapeutiques	66
C. Nouvelles perspectives thérapeutiques en RIT alpha et bêta : le syndecan-1 et l'endothélium vasculaire	68
I. Le ciblage du syndecan-1 dans le cancer du sein	68
1. Le cancer du sein : rappels épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques	68
a. Données épidémiologiques	68
b. Les aspects cliniques	69
c. La progression tumorale	70
2. Les thérapies actuelles et émergentes	71
a. Le traitement des cancers localisés	71
b. Les traitements adjuvants	71
c. Les thérapies ciblées	72
II. Le syndecan-1 (CD138)	72
1. Généralités	72
2. Structure	73
3. Régulation	74
4. Fonctions	74
5. Syndecan-1 et transition épithélio-mésenchymateuse	76
6. Expression du syndecan-1 dans le carcinome mammaire et valeur pronostique	77
7. Le syndecan-1 : intérêt du ciblage en RIT	78
8. Syndecan-1 et myélome multiple	79
III. Le ciblage de l'endothélium vasculaire en RIT α	81
1. L'endoglin (CD105) : généralités	82
2. Structure protéique du CD105	82
3. Les fonctions biologiques du CD105	83
4. Expression du CD105	83
5. CD105 et angiogenèse	84
6. CD105 : facteur pronostique	85
7. Ciblage de l'endoglin en RIT α	85
RESULTATS	87
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	88
Résultats - Partie I : RIT β du cancer du sein	89
A. Intérêt du modèle	90
B. Mise en place du modèle humain de cancer du sein	90
I. Détermination du nombre de sites antigéniques et de l'affinité de l'anticorps B-B4	90
II. Immunoréactivité de l'anticorps B-B4 radiomarqué à l' ^{125}I	92
III. Immunohistochimie du B-B4 sur coupes de carcinome mammaire	93
IV. Etude de biodistribution de l'anticorps B-B4 radiomarqué à l' ^{125}I	95
C. Etude de toxicité et évaluation de la dose maximale tolérée (DMT)	99
I. Etude de la toxicité intrinsèque de l'anticorps B-B4	99
II. Détermination de la dose maximale tolérée (DMT)	100
III. Evaluation de la toxicité de la RIT β utilisant l' ^{131}I /B-B4	100
D. Etude de la réponse tumorale à l'essai de RIT β utilisant l' ^{131}I /B-B4	102

Résultats - Partie II : RIT α du cancer du sein 106

A. Ciblage du syndecan-1 en RIT α utilisant le ^{213}Bi	107
I. Radiomarquage du B-B4 au ^{213}Bi	107
1. Couplage de l'anticorps au CHX-A"-DTPA	107
2. Immunoréactivité de l'anticorps couplé au CHX-A"-DTPA	108
3. Marquage de l'anticorps B-B4 couplé au ^{213}Bi	109
II. Evaluation de la toxicité du ^{213}Bi	110
1. Détermination de la dose toxique du B-B4/ ^{213}Bi	110
2. Evaluation de la toxicité hématologique du B-B4 couplé au ^{213}Bi	111
III. Evaluation de l'efficacité thérapeutique du B-B4 couplé au ^{213}Bi	112
1. Etude de la réponse tumorale	112
2. Ciblage spécifique et non spécifique en RIT α	114
a. Etude de la toxicité hématologique non spécifique	114
b. Suivi pondéral	116
c. Evaluation de la spécificité du ciblage de l'anticorps B-B4 couplé au ^{213}Bi	116
IV. Ciblage de la néo-vascularisation tumorale en RIT alpha	118
1. Choix de l'endoglin (CD105)	118
2. Etude de la biodistribution de l'anticorps MJ7/18	118
3. RIT alpha utilisant l'anticorps MJ7/18 couplé au ^{213}Bi	122
4. RIT alpha fractionnée utilisant l'anticorps MJ7/18 couplé à l' ^{211}At	125
a. Radiomarquage de l'anticorps MJ7/18	125
b. Etude du potentiel toxique de l' ^{211}At couplé au MJ7/18	125
c. Etude de la toxicité hématologique de l' ^{211}At couplé au MJ7/18	127

Matériels et méthodes 129

A. Mise en place des modèles pré-cliniques	130
I. Culture des différentes lignées cellulaires	130
1. La lignée MDA-MB-468	130
2. La lignée U266	130
II. Les anticorps	131
III. Production des anticorps MJ7/18 et OKT3	131
1. Culture des hybridomes	131
2. Purification des anticorps sur colonne de protéine G	131
IV. Caractérisation de l'anticorps B-B4	132
1. Marquage de l'anticorps à l'iode 125 (^{125}I)	132
2. Test d'immunoréactivité des anticorps : analyse par la méthode de Lindmo	133
3. Test de liaison à l'équilibre	134
V. L'étude de biodistribution des anticorps B-B4, MJ7/18 et 7D4	134
B. Essais de RIT β et α <i>in vivo</i>	135
I. RIT β du cancer du sein	135
1. Le modèle animal	135
2. Etude de doses	135
3. Etude de toxicité	136
4. L'essai de RIT β	136
5. Immunohistochimie sur coupes de tissus de carcinome mammaire	137
6. Les analyses statistiques	137
II. RIT α du cancer du sein	138
1. Radiomarquage des anticorps au ^{213}Bi	138
a. Réaction de couplage au CHX-A"-DTPA	138
b. Purification des vecteurs couplés	138
c. Calcul du nombre de ligands par vecteur	139
d. Test d'immunoréactivité de l'anticorps B-B4 couplé au CHX-A"-DTPA	139
e. Radiomarquage des anticorps au ^{213}Bi	140
2. Les essais <i>in vivo</i>	141
a. Le modèle animal	141
b. Etude de toxicité	141
3. Essais de RIT α utilisant le ^{213}Bi	141
a. Evaluation de la toxicité du B-B4/ ^{213}Bi	141

b.	Evaluation de la spécificité du ciblage du B-B4 couplé au ^{213}Bi	142
c.	Ciblage de l'endothélium vasculaire utilisant l'anticorps MJ7/18 couplé au ^{213}Bi	142
4.	Ciblage de l'endothélium vasculaire à l'aide de l'anticorps MJ7/18 couplé à l' ^{211}At	142
a.	Radiomarquage de l'anticorps MJ7/18 à l' ^{211}At	142
b.	Essai de RIT α utilisant l'anticorps MJ7/18 couplé à l' ^{211}At	144
DISCUSSION		145
Partie I : RIT β du carcinome mammaire		146
Partie II : RIT α du carcinome mammaire		148
A.	Ciblage du syndecan-1	148
B.	Ciblage de la néo-vascularisation tumorale	149
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		152
Références bibliographiques		155
Annexe		180

Liste des abréviations

β 2m : bêta2microglobuline
AcBs : Anticorps bi-spécifique
ACE : Antigène carcino-embryonnaire
ADCC : Antibody-Dependant Cell Cytotoxicity
ADN : Acide désoxyribonucléique
AES : Affinity Enhancement System
ARN : Acide ribonucléique
AS : Activité spécifique
ATII : Angiotensine II
bFGF : basic Fibroblast Growth Factor
BMP : Bone Morphogenic Protein
CCI : Cancer canalaire infiltrant
CCIS : Cancer canalaire in situ
CD : Cluster de Différenciation
CDC : Complement Dependant Cytotoxicity
CDR : Complementary Determining Region
CH : Constant Heavy
CHX"-A-DTPA : acide trans-cyclohexyltriamine pentacétique
CL : Constant Light
CLI : Cancer lobulaire infiltrant
DMPS : acide 2,3-dimercapto-1-propanesulfonique
DMT : Dose maximale tolérée
DOTA : acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-N,N',N'',N'''-tétraacétique
DOTMP : acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraméthylène phosphonique
DTPA : acide diéthylène triamino pentaacétique
EBR : Effet biologique relatif
EGF : Epidermal Growth Factor
Fc : Fragment constant
FDA : Food and Drug Administration
FDG : 2-Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose
FERM : Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin
FITC : Fluoresceine isothiocyanate
HACA : Human Anti-Chimeric Antibody
HAHA : Human Anti-human Antibody
HAMA : Human Anti-Mouse Antibody
HEHA : acide 1,4,7,10,13,16-hexaazacyclohexadécane-N,N',N'',N''',N''',N''''-hexaacétique
HER2 : Human Epidermal Growth Factor 2
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HLA : Human Leucocyte Antigen
HS : Heparan Sulfate
HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IFP : Interstitial Fluid Pressure
IL-2 : Interleukine-2
IRM : Imagerie par résonance magnétique
Kd : Constante d'affinité
kDa : Kilo Dalton

LH-RH : Luteinising Hormone - Releasing Hormone
LLC : Leucémie lymphoïde chronique
LNH : Lymphome non hodgkinien
MAG3 : Mercaptoacetylglycylglycylglycine
MCSP : Melanoma Associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan
MeV : Mega électron-volts
MMP : Métalloprotéases de la matrice
MUC-1 : Mucine 1 Cell Surface Associated
N-CAM : Neuronal Cell Adhésion molecule
NK : Natural Killer
NOD : Non Obese Diabetic
PAI2 : Plasminogen Activator Inhibitor Type 2
PBS : Phosphate Buffer Saline
P-CAM : Placental Cell Adhesion molecule
PDGF : Platelet Derived Growth Factor
PDZ : Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (DigA)
Zonula occludens-1 protein (zo-1)
PM : Poids moléculaire
PSMA : Prostate Specific Membrane Antigen
SAB : N-succinimidyl 3(trimethylstannyl)-benzoate
ScFv : Single-chain variable fragments
SCID : Severe Combined Immuno Deficient
SFC : Syndrome de Fuite Capillaire
SVF : Sérum de veau fœtal
TAG-72 : Tumor Associated Glycoprotein 72
TCR : T Cell Receptor
TEL : Transfert d'énergie linéique
TEP : Tomographie par émission de positons
TETA : acide 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-*N,N',N'',N'''*-tétraacétique
TGF : Transforming Growth Factor
TNF : Tumor Necrosis Factor
uPA : urokinase Plasminogen Activator
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VH : Variable Heavy
VL : Variable Light

Table des illustrations

Figure 1. Les différents modes d'action des anticorps. _____	7
Figure 2. Parcours et dépôt d'énergie des particules bêta et alpha. _____	14
Figure 3. Effets directs et indirects des rayonnements ionisants. _____	19
Figure 4. Conséquences des effets des rayonnements ionisants. _____	21
Figure 5. Schéma de décroissance de l'actinium 225 et du bismuth 213. _____	35
Figure 6. Schéma de décroissance de l'astate 211. _____	37
Figure 7. Structure de base d'une IgG1. _____	43
Figure 8. Représentation schématique des différents formats d'anticorps. _____	45
Figure 9. Représentation schématique du développement des anticorps thérapeutiques. _____	48
Figure 10. Le système AES (Affinity Enhancement System). _____	59
Figure 11. Les différents types de cancers du sein. _____	70
Figure 12. Structure générale du syndecan-1. _____	74
Figure 13. Fonctions biologiques du syndecan-1 _____	75
Figure 14. Etude de la liaison à l'équilibre de l'anticorps B-B4 marqué à l' ¹²⁵ I. _____	91
Figure 15. Détermination de la fraction immunoréactive de l'anticorps B-B4 radiomarqué à l' ¹²⁵ I. _____	93
Figure 16. Etude immunohistochimique du B-B4 sur coupes de tumeurs MDA-MB-468. _____	94
Figure 17. Etude de la biodistribution de l'anticorps B-B4 marqué à l' ¹²⁵ I. _____	96
Figure 18. Biodistribution de l'anticorps B-B4 couplé à l' ¹²⁵ I. _____	97
Figure 19. Comparaison de la biodistribution de l'anticorps B-B4 et 7D4. _____	98
Figure 20. Etude comparative de la croissance tumorale sur des lots de souris ayant reçu une solution de PBS IX et une dose de l'anticorps B-B4 non radiomarqué. _____	99
Figure 21. Etude de la toxicité hématologique de l'anticorps B-B4 couplé à l' ¹³¹ I. _____	101
Figure 22. Evaluation de la réponse tumorale de l'anticorps B-B4 couplé à l' ¹³¹ I. _____	103
Figure 23. Etude comparative des volumes tumoraux moyens. _____	103
Figure 24. Etude du temps de doublement des tumeurs traitées avec l'anticorps B-B4 couplé à l' ¹³¹ I. _____	104
Figure 25. Immunoréactivité de l'anticorps B-B4 couplé au CHX-A"-DTPA. _____	108
Figure 26. Bilan hématologique en réponse à l'anticorps B-B4 couplé au ²¹³ Bi. _____	112
Figure 27. Etude de la réponse tumorale à l'anticorps B-B4 couplé au ²¹³ Bi. _____	113
Figure 28. Bilan hématologique de l'anticorps non spécifique du syndecan-1, l'OKT3 couplé au ²¹³ Bi. _____	115
Figure 29. Etude comparative du poids des souris ayant reçu les anticorps B-B4 et OKT3 couplés au ²¹³ Bi. _____	116
Figure 30. Etude comparative de la réponse tumorale après administration des anticorps B-B4 et OKT3 couplés au ²¹³ Bi. _____	117
Figure 31. Etude de la biodistribution de l'anticorps MJ7/18 couplé à l' ¹²⁵ I. _____	120
Figure 32. Etude comparative des biodistributions des anticorps MJ7/18, B-B4 et 7D4 couplés à l' ¹²⁵ I. _____	122
Figure 33. Etude comparative de la réponse tumorale après administration des anticorps MJ7/18OKT3 et B-B4 couplés au ²¹³ Bi. _____	124
Figure 34. Etude du potentiel thérapeutique de l'anticorps MJ7/18 couplé à l' ²¹¹ At. _____	126
Figure 35. Bilan hématologique après administration de l'anticorps MJ7/18 couplé à l' ²¹¹ At. _____	127

Tableau 1. Principaux radioéléments bêta utilisés en clinique et leurs caractéristiques physico-chimiques. __	24
Tableau 2. RIT β des tumeurs hématologiques : bilan des études cliniques. _____	30
Tableau 3. Principaux isotopes émetteurs alpha et caractéristiques de désintégration. _____	40
Tableau 4. Expression du syndecan-1 dans le cancer du sein. _____	80
Tableau 5. Expression de l'endoglin dans les tissus normaux humains. _____	84
Tableau 6. Bilan du pourcentage de mortalité et de la perte pondérale pour chaque dose administrée du radioimmunoconjugué formé par l'anticorps B-B4 couplé au ^{213}Bi , permettant de déterminer la dose maximale tolérée (DMT) et la dose létale 50 (DL50). _____	111

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le cancer du sein est la première cause de mortalité par tumeur maligne chez la femme. Les thérapeutiques conventionnelles ont gagné en efficacité ces dernières années. Cependant, malgré les progrès incontestables en chirurgie, radiothérapie ou chimiothérapie, le taux de mortalité reste élevé en raison notamment de la difficulté à traiter la maladie résiduelle et la récurrence.

Les cancers dépistés suffisamment tôt répondront davantage aux traitements. Néanmoins le pronostic reste mauvais pour des cancers de stade avancé. Ceci est dû bien souvent à la présence de métastases. Des investissements importants ont été consacrés à la recherche contre le cancer du sein aussi bien sur le plan diagnostique que thérapeutique. Les efforts doivent donc être poursuivis, en particulier pour le développement de traitements systémiques ciblant plus spécifiquement le tissu néoplasique. Depuis une vingtaine d'année, les anticorps monoclonaux sont utilisés en clinique et permettent de par leur fonction biologique de traiter efficacement certains types de cancer. En médecine nucléaire, les anticorps monoclonaux sont apparus comme des vecteurs de choix pour déposer à la surface des cellules cancéreuses, des radioéléments pour le ciblage des tumeurs en radioimmunothérapie. Cette approche utilisée actuellement en clinique pour le traitement de certains lymphomes, reste essentiellement au stade d'évaluation pré-clinique dans le traitement des pathologies cancéreuses comme le carcinome mammaire à un stade plus ou moins avancé. Durant ce travail de thèse, nous avons ainsi cherché évalué le potentiel thérapeutique du ciblage spécifique de deux nouvelles molécules, surexprimées dans le carcinome mammaire : le syndecan-1(CD138) en radioimmunothérapie alpha et bêta et l'endoglin (CD105), en radioimmunothérapie alpha.

A. Les différentes lignes de traitements contre le cancer

I. Les traitements classiques

Parmi les traitements classiques du cancer pratiqués actuellement en routine, on peut distinguer : les traitements locaux (chirurgie, radiothérapie externe) et les traitements systémiques (chimiothérapie). Dans la plupart des cas, les différentes approches thérapeutiques sont utilisées en association, en alternance ou en concomitance afin de potentialiser leurs effets anti-tumoraux. Dans la majorité des cas de tumeurs solides, le traitement de référence le plus efficace reste l'ablation de la tumeur par intervention chirurgicale. Ce traitement peut conduire à la guérison si la tumeur est localisée et s'il n'y a pas de processus d'envahissement des autres organes. En présence de métastases, **la chirurgie** est souvent nécessaire en première intention et des traitements complémentaires sont utilisés pour éliminer les cellules métastatiques.

La radiothérapie externe est, après la chirurgie, le traitement local le plus courant. Elle utilise des sources d'irradiation externe à l'organisme (rayons gamma ou X). La dose globale à délivrer est fixée en fonction de la nature de la tumeur à traiter. Cependant, l'administration de doses élevées localisées entraîne des effets secondaires important le long du trajet des rayons notamment au niveau de la peau et au niveau des tissus sains environnant la tumeur. Il est donc important de fractionner la dose et de l'étaler dans le temps pour permettre d'augmenter l'effet anti-tumoral, sans dépasser le seuil de tolérance des tissus sains. La troisième "arme thérapeutique" classique est **la chimiothérapie**. Ce traitement systémique utilise différentes molécules toxiques, ciblant les cellules en prolifération et bloquant leur capacité de multiplication. Selon leur mécanisme d'action, on distingue :

- les **anti-métabolites**, qui inhibent de façon compétitive la synthèse de l'ADN et la prolifération cellulaire - exemple : méthotrexate
- les **alkylants**, qui modifient les bases de l'ADN - exemple : melphalan (Alkeran[®]) ou cyclophosphamide (Endoxan[®])
- les **poisons du fuseau**, qui bloquent le cycle cellulaire - exemple : paclitaxel (Taxol[®]), vinorelbine (Navelbine[®])
- les **inhibiteurs de topoisomérases I** - exemple : irinotécan (Campto[®]) et **II** exemple : doxorubicine
- et les **agents intercalants** de l'ADN - exemple : idarubicine (Zavedos[®]).

Ces molécules peuvent être administrées isolément ou dans des protocoles de polychimiothérapie combinant des molécules qui induisent des effets cellulaires différents. Dans le traitement curatif des tumeurs solides, la chimiothérapie est en général adjuvante à la chirurgie ou à la radiothérapie. L'efficacité de ce traitement est souvent accompagnée d'effets secondaires importants liés à son action sur les cellules saines en prolifération (cellules de la moelle osseuse, muqueuses, peau).

II. L'hormonothérapie

L'hormonothérapie est un traitement général s'appliquant aux tumeurs dites hormonosensibles comme les carcinomes mammaire, prostatique ou thyroïdien. L'utilisation thérapeutique d'hormones exploite la présence sur des cellules tumorales de récepteurs hormonaux, principalement pour les cancers du sein et de la prostate. La prescription d'une hormonothérapie ne se conçoit que lorsque l'hormonosensibilité du cancer a été prouvée. Le mode d'action de l'hormonothérapie consiste soit à supprimer la production naturelle d'hormones, soit à bloquer la fonction de l'hormone au niveau de son récepteur cellulaire. Il existe actuellement cinq classes thérapeutiques :

- Les **analogues de la LH-RH** qui agissent au niveau hypophysaire en inhibant la production d'hormone gonadotrope, utilisés dans le traitement du cancer de la prostate et du cancer du sein métastatique hormonosensible (exemple : goséréline, Zoladex[®]).
- Les **anti-oestrogènes** représentés par le tamoxifène (Nolvadex[®]) utilisés dans le traitement du cancer du sein métastatique hormonosensible.
- Les **inhibiteurs spécifiques de l'aromatase** responsable de la production des oestrogènes à partir des androgènes (exemple : anastrozole, Arimidex[®]).
- Les **progestatifs** qui agissent au niveau de l'hypophyse en inhibant la synthèse des hormones gonadotropes mais aussi en bloquant les récepteurs de la progestérone.
- Les **anti-androgènes** utilisés dans le cancer de la prostate (exemple : cyprotérone, Androcur[®]).

III. Les thérapies vectorisées

Les phénomènes de chimio- et radorésistance limitent l'efficacité des traitements classiques. Le problème de toxicité au niveau des tissus sains peut être également fatal pour certains patients, plus vulnérables. Les approches de thérapies vectorisées présentent l'avantage d'atteindre spécifiquement les cellules tumorales en préservant les tissus sains environnants. Par ailleurs, il apparaît évident que la progression tumorale dépend des échanges des cellules cancéreuses avec leur microenvironnement. Cela permet d'envisager le ciblage du microenvironnement tumoral pour le traitement des cancers. Ces traitements seront généralement utilisés comme adjuvant d'un médicament cytotoxique (chimiothérapie classique) ou en relais pour stabiliser une maladie résiduelle minimale.

1. L'immunothérapie

L'immunothérapie regroupe les traitements stimulants le système immunitaire afin de déclencher une réponse immune contre les cellules tumorales. Dans le cadre d'études cliniques, ces traitements sont actuellement administrés en association avec les traitements classiques. L'immunothérapie constitue actuellement une quatrième modalité de traitement du cancer après les traitements conventionnels. On distingue généralement l'immunothérapie passive de l'immunothérapie active. L'immunothérapie passive consiste à apporter au patient des anticorps monoclonaux ou des effecteurs cellulaires, tels que les lymphocytes T spécifiques de la tumeur et capables d'induire une réponse tumorale. Dans le cas de l'immunothérapie à l'aide de lymphocytes T, il est nécessaire d'effectuer une sélection *in vitro* des lymphocytes T du patient, spécifiques des cellules tumorales, à partir du sang périphérique ou des cellules infiltrant la tumeur et les ganglions drainant. Ces lymphocytes vont être ensuite amplifiés avant de les injecter en nombre suffisant aux patients, pour pouvoir obtenir une réponse anti-tumorale efficace. L'immunothérapie active à l'inverse, a pour principe d'immuniser activement les patients contre leurs tumeurs par des stratégies de vaccination anti-tumorale. Cette approche thérapeutique hautement spécifique de la tumeur permet en théorie d'éradiquer de manière sélective les tumeurs, sans nuire au patient et de maintenir une mémoire immunologique à long terme permettant de contrôler la récurrence des tumeurs et de s'adapter aux mutations des cellules tumorales qui accompagnent leur multiplication.

L'une des premières stratégies d'immunothérapie anti-tumorale ayant fait ses preuves en clinique est basée sur une immunothérapie passive. Elle consiste à injecter à des patients cancéreux des anticorps monoclonaux dirigés contre différents antigènes tumoraux. Différents mécanismes effecteurs de l'hôte sont alors mis en jeu. Les anticorps monoclonaux sont capables d'activer une réponse cytotoxique vis-à-vis de la tumeur par l'intermédiaire du système du complément (CDC). Ils peuvent également mettre en place une réponse anti-tumorale par les cellules du patient, comme les cellules "Natural Killer" dans un mécanisme de cytotoxicité dépendante de l'anticorps (ADCC). L'ADCC (Hayashi, Treon et al. 2003) est déclenchée par l'interaction entre la partie Fc de l'anticorps fixé à la surface de la cellule tumorale et un récepteur Fcγ exprimé à la surface d'une cellule effectrice (macrophages, cellules NK, neutrophiles). La cellule est alors détruite par phagocytose ou par lyse en fonction de la cellule effectrice recrutée. La CDC (Gelderman, Tomlinson et al. 2004) est initiée par le composant du complément C1q, qui se fixe à la partie Fc de l'anticorps lié à la surface de la cellule tumorale. La destruction de cette cellule peut ensuite être effectuée de manière cellule dépendante ou cellule indépendante (figure 1). La capacité d'un anticorps à déclencher l'un de ces mécanismes d'ADCC ou de CDC a été démontrée avec l'anticorps spécifique de la molécule CD20, le rituximab (Mabthera®) utilisé en clinique pour le traitement de certains lymphomes B, où ces deux mécanismes biologiques sont impliqués. D'autres anticorps monoclonaux utilisés en immunothérapie peuvent agir par blocage de la signalisation d'un facteur de croissance en se fixant à son récepteur spécifique à la surface des cellules cancéreuses (par exemple l'anti-HER2/neu pour le cancer du sein, avec le trastuzumab ou Herceptin®) ou agir sur la tumeur en induisant un signal d'apoptose. Enfin les anticorps monoclonaux sont utilisés de façon indirecte en ciblant le microenvironnement tumoral indispensable à la croissance des tumeurs. C'est le cas des anticorps comme le bevacizumab (Avastin®), spécifique d'un facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (le VEGF pour *Vascular Endothelial Growth Factor*) pour le cancer du côlon et d'autres types de tumeurs.

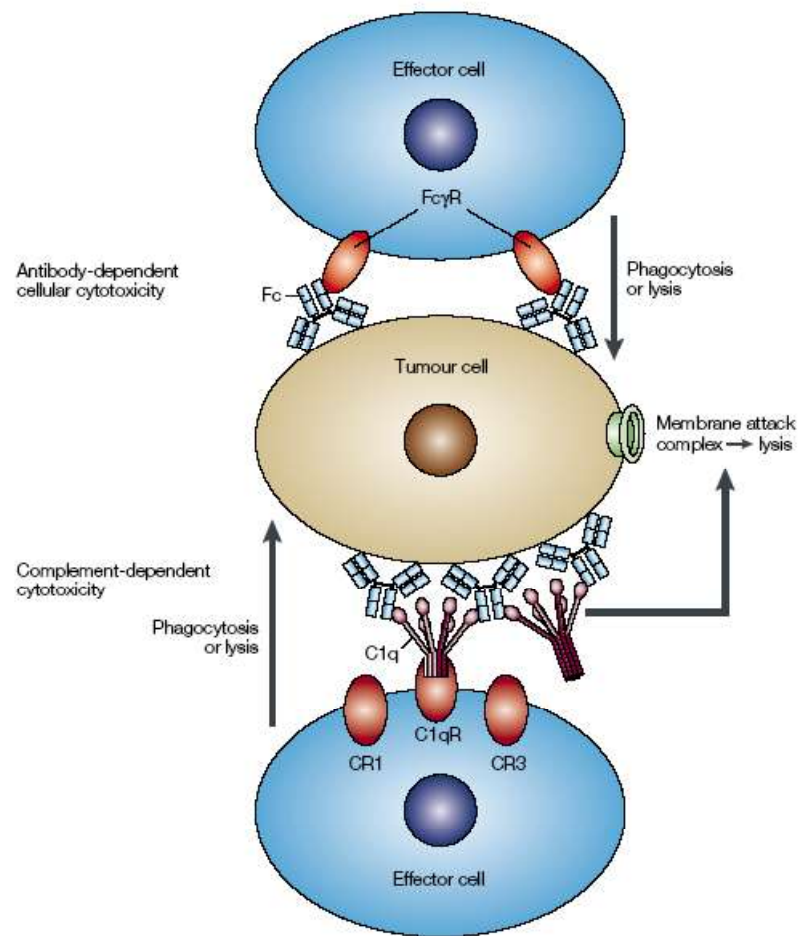


Figure 1. Les différents modes d'action des anticorps. **CDC.** Le complexe protéique C1q/C1 du complément se fixe sur la région Fc d'anticorps liés à leur cible et va activer le système du complément aboutissant à la formation du complexe d'attaque membranaire et à la lyse cellulaire. **ADCC.** Les récepteurs FcγR se fixent sur la région Fc d'anticorps liés à leur cible conduisant ainsi à la lyse ou la phagocytose induite par une cellule effectrice du système immunitaire. (D'après Carter 2001).

2. Les traitements anti-angiogéniques

Le rôle essentiel de l'angiogenèse en cancérologie a été initialement défini il y a plus de 30 ans par Folkman (Folkman 1971). L'angiogenèse est indispensable à la croissance tumorale au-delà d'un volume de 1-2 mm³ et facilite également l'entrée des cellules tumorales dans la circulation sanguine ou lymphatique, entraînant la formation de métastases à distance. L'angiogenèse a aussi été identifiée comme un facteur pronostique péjoratif, fréquemment associé à la progression tumorale et au risque métastatique.

Chez l'adulte sain, l'angiogenèse est un processus complexe régulé de manière étroite par un équilibre entre facteurs pro- et anti-angiogéniques. Des facteurs de croissance tels que le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor* ou facteur de croissance endothélial vasculaire) et le PDGF (*Platelet-Derivated Growth Factor* ou facteur de croissance dérivé des plaquettes) sont proangiogéniques et leur activité est due à leur liaison à des récepteurs de membranes spécifiques de type tyrosine kinase. Après interaction avec le ligand, la partie intra-cellulaire du récepteur est activée et initie une cascade de signalisation intracellulaire (impliquant souvent des sérines et thréonines kinases), qui entraîne plusieurs types de réponses cellulaires, nécessaires à la formation des néo-vaisseaux. D'autres facteurs associés à l'angiogenèse font l'objet d'études récentes comme l'endoglin (CD105), dont la valeur pronostique semble particulièrement intéressante. La surexpression de ce facteur dans différents types de cancers, comme celui de la prostate ou du sein, offre de nouvelles pistes thérapeutiques.

Les traitements anti-angiogéniques ont été développés avec l'objectif d'épargner les structures vasculaires stables dans les tissus normaux tout en agissant sur les cellules endothéliales de la tumeur. Deux approches ont été développées récemment avec succès : l'inhibition des facteurs de croissance angiogéniques (ex. le bevacizumab, dirigé contre le VEGF) et l'inhibition de leurs récepteurs de membrane de type tyrosine kinase (ex. le soréfanid, le sunitinib ou le lapatinib). D'autres approches sont actuellement en cours d'évaluation, telles que l'inhibition des métalloprotéases de la matrice cellulaire (ex. marimastat), ou les molécules ciblant les interactions intercellulaires (ex. le cilengitide, inhibiteur sélectif du récepteur de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$).

Les agents anti-angiogéniques n'agissent pas directement sur les cellules tumorales mais sur une population cellulaire normale : les cellules endothéliales, cellules constitutives des vaisseaux sanguins. Ils n'éradiquent pas la tumeur, mais contrôlent sa croissance. Cette

approche est donc bien adaptée à une association thérapeutique avec des traitements classiques cytotoxiques comme la chimiothérapie, directement centrés sur la destruction des cellules tumorales proprement dites.

3. La radiothérapie vectorisée

Contrairement à la radiothérapie externe, qui est une méthode de traitement locorégional des cancers, la radiothérapie vectorisée consiste à administrer une molécule marquée par un élément radioactif se fixant spécifiquement sur les cellules tumorales. La concentration du vecteur radiomarqué au niveau de la tumeur permet de détruire les cellules cancéreuses en les irradiant. Il s'agit d'un traitement systémique qui peut agir à la fois sur la tumeur primaire et sur ses métastases. L'efficacité de la radiothérapie vectorisée nécessite un taux de rétention élevé, sélectif et prolongée du radiopharmaceutique par la tumeur. La spécificité du vecteur pour la tumeur permet d'administrer une irradiation maximale des cellules tumorales, en garantissant un minimum de toxicité au niveau des cellules saines. Les vecteurs peuvent être de nature peptidique ou protéique comme les anticorps et leurs fragments. Actuellement on distingue la thérapie utilisant des peptides spécifiques d'un récepteur, surexprimé par les cellules tumorales et la radioimmunothérapie utilisant un anticorps ou l'un de ses fragments.

a. La radiothérapie vectorisée utilisant des peptides

La radiothérapie vectorisée, utilisant des peptides radiomarqués peut agir à la fois sur la tumeur primitive et sur ses métastases. Elle constitue une alternative thérapeutique séduisante, qui se développe actuellement. Les principaux peptides utilisés pour la radiothérapie vectorisée des tumeurs endocrines sont les analogues de la somatostatine. Cette voie s'est développée grâce à l'utilisation de radiopharmaceutiques spécifiques des tumeurs endocrines dans un but thérapeutique. Elle a été initialement développée pour l'imagerie (Beierwalters 1979). La plupart des tumeurs neuroendocrines surexpriment un grand nombre de récepteurs membranaires pour la somatostatine. La possibilité d'obtenir des analogues peptidiques radiomarqués de la somatostatine permet d'irradier sélectivement ces tumeurs à travers l'internalisation du complexe radiopeptide/récepteur. Les pré-requis d'un tel

traitement sont la présence de récepteur de haute affinité sur les cellules tumorales, et le choix d'une méthode de couplage qui permettent d'obtenir une bonne stabilité du radiomarquage, une activité hautement spécifique et une forte affinité du radiopharmaceutique pour le récepteur avec liaison rapide et internalisation du ligand. Les premières tentatives de radiothérapie par peptides radiomarqués ont été réalisées en utilisant l' ^{111}In -octreotide (octréoscan[®]). L' ^{111}In émet principalement des rayonnements γ , utilisés pour la détection mais aussi des électrons de conversion interne et des électrons Auger, dont le rayon d'action cytotoxique est de l'ordre de 10 μm . Le bénéfice de l'utilisation de l' ^{111}In -octreotide analogue de la somatostatine est essentiellement symptomatique, les diminutions du volume tumoral n'étant décrites que dans de rares cas, au prix d'une irradiation médullaire relativement importante. Les résultats décevants s'expliquent par le faible rayon d'action des électrons Auger. Des réponses tumorales objectives et durables sont obtenues avec les nouveaux analogues couplés à des émetteurs β (Otte, Herrmann et al. 1999 ; Waldherr, Pless et al. 2001; Bodei, Cremonesi et al. 2003; Jamar, Barone et al. 2003; Kwekkeboom, Bakker et al. 2003). De très nombreuses tumeurs peuvent exprimer des récepteurs peptidiques. Plusieurs peptides marqués font actuellement l'objet d'études pré-cliniques ou de phase I parmi lesquels la CCK-gastrine dans les cancers médullaires de la thyroïde, la bombésine dans les tumeurs de prostate, ou le neuropeptide NYP (Y(1)) dans la carcinome mammaire (De Jong, Valkema et al. 2002 ; De Jong, Kwekkeboom et al. 2003).

b. La radioimmunothérapie (RIT)

La radioimmunothérapie est une forme de radiothérapie interne ou vectorisée utilisant, le plus souvent, comme agent de vectorisation un anticorps monoclonal ou des fragments d'anticorps, couplés à des radioéléments émetteurs de particules bêta (β), alpha (α) ou électrons Auger qui induisent la destruction des cellules ciblées. La RIT utilisant des émetteurs β (iode 131, yttrium 90, rhénium 186 et 188) a été développée en cancérologie pour le traitement des tumeurs de petites tailles ou à un stade de maladie résiduelle, mais elle a surtout montré son efficacité en hématologie dans le traitement des lymphomes non hodgkiniens (LNH) (Press, Eary et al. 1993; Kaminski, Tuck et al. 2005). A l'heure actuelle, peu d'applications en clinique utilisent la RIT α , l'essentiel de la littérature internationale concerne les approches pré-cliniques. Ce retard de la recherche en RIT α , comparé à la RIT β est en partie une conséquence de la faible disponibilité d'isotopes appropriés et de leur coût.

Le travail de thèse que j'ai développé a consisté à évaluer la pertinence de la RIT β du cancer du sein en ciblant l'antigène CD138 (syndecan-1) surexprimés dans cette pathologie. Ce même modèle a permis d'aborder la RIT α afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de cette approche dans le traitement du carcinome mammaire, au stade métastatique ou de maladie résiduelle. Nous avons également étudié le potentiel thérapeutique de la RIT α dans un modèle de ciblage de l'endothélium vasculaire.

B. La radioimmunothérapie

L'intérêt des traitements par médicaments radioactifs trouve sa justification dans la possibilité largement démontrée, de guérir les cancers thyroïdiens différenciés, y compris au stade métastatique, avec l'iode 131 (^{131}I) qui présente un tropisme prononcé pour la thyroïde et permet une accumulation de doses à cet organe capable de détruire les cellules cancéreuses (Moss 1999). Actuellement la possibilité d'étendre cette stratégie à d'autres tumeurs grâce à des vecteurs appropriés est communément admise. L'utilisation de l'irradiation continue à bas débit de dose par des radiopharmaceutiques administrés par voie systémique constitue une modalité thérapeutique originale, validée et ayant désormais à son actif des succès thérapeutiques qui rendent son utilité en clinique, y compris en terme de survie globale, incontestable. L'efficacité de la RIT a été démontrée pour le traitement des lymphomes B et est actuellement utilisée en consolidation après un traitement par chimio-immunothérapie. Des résultats intéressants ont également été obtenus dans le traitement du cancer de la thyroïde métastatique ou dans certains cancers du poumon exprimant l'ACE (Antigène carcino-embryonnaire), en association après chirurgie ou avec des systèmes de pré-ciblage ce qui permet d'envisager l'extension de l'utilisation de la RIT aux tumeurs solides (Barbet, Kraeber-Bodere et al. 1999).

I. Principe

La RIT en oncologie, consiste à traiter des tumeurs radiosensibles, de manière relativement spécifique, à l'aide d'anticorps monoclonaux couplés à des isotopes radioactifs. Son efficacité provient essentiellement du rayonnement émis par le radioimmunoconjugué qui permet d'obtenir le dépôt d'une dose d'irradiation au niveau du site tumoral. L'anticorps

monoclonal peut aussi contribuer à l'effet tumoricide en stimulant les mécanismes effecteurs du système immunitaire et en induisant une mort apoptotique de la cellule cible. Cependant les doses et le schéma d'injection utilisés en radioimmunothérapie diffèrent beaucoup de ceux utilisés en immunothérapie classique à l'aide d'anticorps biologiquement actifs, du point de vue des quantités et de la fréquence d'injection. L'activité biologique des anticorps radiomarqués en RIT reste donc marginale dans la réponse globale de la tumeur par rapport à l'effet anti-tumoral directement imputable à l'irradiation.

Ce mécanisme reste dépendant de la dose d'anticorps administrée. Lorsque les anticorps sont radiomarqués, l'effet anti-tumoral augmente car les mécanismes de toxicité radiobiologique se conjuguent aux mécanismes immunologiques. L'efficacité et la toxicité de la RIT dépendent du choix de l'anticorps, du radioélément, de l'antigène et des caractéristiques de la tumeur. Ces facteurs conditionnent la dose absorbée par la tumeur et les tissus sains, l'homogénéité du dépôt et le débit de dose. L'efficacité de la RIT dépend également de la radiosensibilité tumorale.

II. Pré-requis

La fixation et la rétention du radiopharmaceutique dans la tumeur conditionnent le succès de la radiothérapie interne. Idéalement la fixation tumorale doit être intense et la rétention doit être prolongée. La période physique du radioélément et l'élimination par l'organisme de l'ensemble de la molécule (représentée par la période biologique) permettent d'évaluer le temps de séjour du radiopharmaceutique. La fixation dans les tissus sains doit être faible et la rétention courte, afin de minimiser l'irradiation non spécifique et la toxicité associée. La période effective (T_e) est fonction de la période physique (T_p) et de la période biologique (T_b) selon la formule $1/T_e = 1/T_p + 1/T_b$. Elle correspond au temps nécessaire pour que la radioactivité spécifique des molécules d'une population donnée ait diminué de moitié dans l'organisme, suite à son élimination et à la décroissance radioactive du radionucléide. La période effective est toujours plus petite que les deux autres. Une longue période effective conduit à une irradiation prolongée du tissu tumoral mais également des tissus sains voisins. Un compromis doit être trouvé entre le degré de rétention du radioimmunoconjugué et la toxicité au niveau des tissus sains.

III. Comparaison RIT bêta (β) et alpha (α)

La RIT α représente une approche comparable à la RIT β , mais de nombreuses spécificités les séparent. Ces différences vont permettre de les adapter à chaque type de tumeurs.

1. Energie cinétique et parcours moyen tissulaire

L'énergie cinétique des particules β est de l'ordre de 0,3 à 2,3 MeV. Cette énergie correspond à un parcours moyen dans les tissus d'environ 0,5 à 12 mm. Ce parcours tissulaire permet aux radioéléments β de traverser plusieurs diamètres cellulaires (10 à 1000). Les cellules de la tumeur sont donc irradiées par les anticorps radiomarqués fixés à leur surface et par ceux fixés sur les cellules environnantes, phénomène que l'on désigne comme l'effet de feu croisé (Nourigat, Badger et al. 1990) (figure 2). Cette caractéristique permet d'obtenir un dépôt d'énergie plus homogène au sein de la tumeur (Milenic, Brady et al. 2004). L'énergie des particules α est plus importante que celle déposée par les radioéléments β , ce phénomène s'explique par la différence de charge et de masse entre les deux types de particules : les particules α sont des noyaux d'hélium et les particules β , de simple électrons. L'énergie cinétique des particules α est de l'ordre de 5 à 9 MeV, et le parcours moyen dans les tissus est de l'ordre de 50 à 90 μm , ce qui revient à traverser 2 à 10 diamètres cellulaires (figure 3). La désintégration α permet ainsi de délivrer une plus grande quantité d'énergie dans un volume plus réduit, ce qui confère à l'irradiation alpha une plus grande cytotoxicité à nombre de désintégrations équivalentes. En contrepartie, l'effet de feu croisé est limité en RIT alpha.

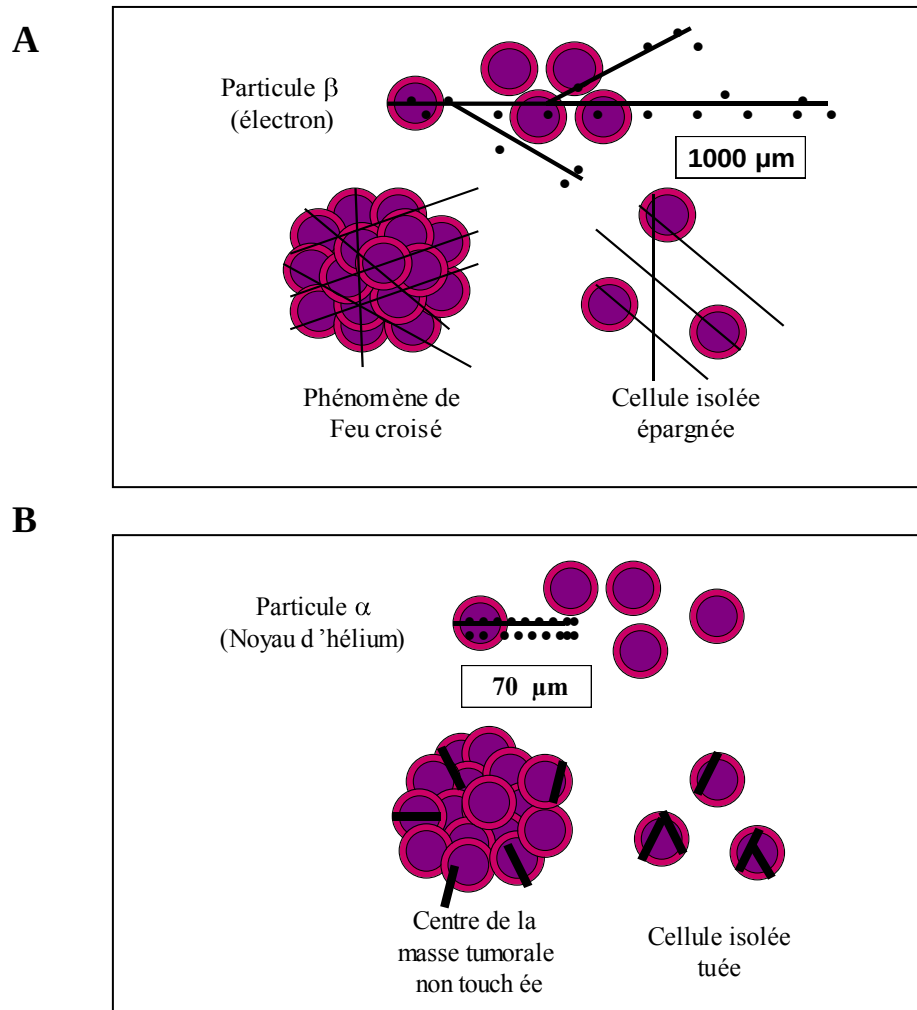


Figure 2. Parcours et dépôt d'énergie des particules bêta (A) et alpha (B) sur des cellules isolées ou regroupées en amas.

2. Notion de transfert d'énergie linéique (TEL)

Lorsqu'une particule ionisante pénètre la matière, elle communique de l'énergie au milieu, tout au long de sa trajectoire. Ce transfert d'énergie dépend de la nature de la particule et de celle du milieu. On le caractérise par la notion de transfert d'énergie linéique, défini comme le quotient de l'énergie moyenne communiquée au milieu le long d'un élément de sa trajectoire par la longueur de cet élément. On l'exprime généralement en $\text{keV}/\mu\text{m}$. Le concept

est essentiel pour comprendre l'effet radiobiologique. Le TEL détermine en effet la cytotoxicité du traitement.

Les particules β ont un parcours plus long, corrélé à leur énergie, avec un TEL de l'ordre de 0,1 à 1 keV/ μm , ils peuvent traverser plusieurs cellules même lorsqu'ils se localisent sur la membrane cellulaire, par vectorisation à l'aide d'un anticorps spécifique d'un antigène membranaire. Un parcours de plusieurs diamètres cellulaires génère un phénomène de feu croisé, entre les cellules voisines, qui compense l'hétérogénéité de la distribution tumorale et améliore l'efficacité thérapeutique. Cependant, un parcours supérieur à une centaine de diamètres cellulaires conduit à une irradiation non négligeable des cellules saines voisines. Le faible dépôt d'énergie sur le parcours intra-cellulaire d'une particule β est faible et insuffisant pour obtenir un effet cytotoxique. L'efficacité de la RIT β dépend donc de la quantité de radiopharmaceutiques présent à la surface de la cellule et de l'énergie déposée. Le TEL des particules α relativement élevé, est de l'ordre de 60 à 230 keV/ μm (Hassfjell and Brechbiel 2001). Il a été démontré qu'une seule particule α peut conduire à la destruction d'une seule cellule, avec une probabilité de 20 à 40% (Strickland, Vaidyanathan et al. 1994; Soyland and Hassfjell 2000), alors que plusieurs centaines de particules β sont nécessaires pour détruire une cellule (Humm and Cobb 1990).

3. L'efficacité biologique relative (EBR)

L'efficacité biologique relative est un coefficient déterminé expérimentalement pour un effet donné. Il est égal au rapport de la dose absorbée d'un rayonnement de référence à la dose absorbée du rayonnement étudié produisant le même effet biologique. Ce rayonnement de référence est un rayonnement X de 250 kV pour lequel l'EBR est égal à 1. Pour exemple, l'EBR des particules α est de l'ordre de 5 à 100 selon le type d'effet que l'on considère (Hall 1994). Les particules β ont un EBR proche de 1. Les particules α sont donc beaucoup plus radiotoxiques que les particules β . La possibilité de tuer une cellule avec moins de 10 particules α les rend particulièrement attractives pour le ciblage de cellules isolées ou de micrométastases. La nécessité de l'effet de feux croisés pour amplifier l'efficacité des particules β rend ces dernières plus appropriées pour l'éradication de petites masses tumorales, dans une situation où la cible est peu exprimée. Cette caractéristique leur permet également de détruire des cellules dont les cibles sont difficilement accessibles.

4. Etudes comparatives

Quelques études réalisées *in vivo* ont permis de comparer l'efficacité des particules α et β sur un modèle tumoral identique. La première étude a été réalisée par l'équipe de Behr en 1999, sur un modèle de xénogreffe de carcinome colique humain, réalisé chez la souris *nude* préalablement greffée par la lignée GW-39 en sous-cutanée. Elle consistait à administrer par voie intraveineuse un fragment Fab' de l'anticorps CO17-1A (spécifique d'un antigène exprimé dans la majorité des carcinomes coliques, le CD326) le vecteur était couplé soit au bismuth 213 (^{213}Bi -émetteur de particules α), soit à l'yttrium 90 (^{90}Y -puissant émetteur de particules β). Les résultats ont prouvé l'efficacité du ^{213}Bi , par une inhibition significative de la croissance tumorale et un allongement du temps de survie des animaux traités. La toxicité rénale reste le facteur limitant cette étude indépendamment du type de rayonnement utilisé. Pour des doses équitoxiques, une rémission a été observée chez 95% des animaux traités avec le ^{213}Bi (25,9 MBq-700 μCi), et seulement 20% avec l' ^{90}Y (9,25 MBq- 250 μCi) (Behr, Behe et al. 1999). Les doses maximales tolérées, ont été fixées à 9,25 MBq (250 μCi) pour l' ^{90}Y et 25,9 MBq (700 μCi) pour le ^{213}Bi .

Une stratégie de ciblage en deux temps a également été développée, dans le traitement de la leucémie à cellules T, positive pour le CD25. Cette étude a été conduite chez la souris NOD/SCID, préalablement greffée par la lignée MET-1 par voie intra-péritonéale. Le vecteur, un anticorps dirigé contre le CD25, couplé à la streptavidine est administré dans un premier temps, suivi par l'administration d'un agent permettant d'éliminer l'excès du vecteur circulant. Le radioélément, soit le ^{213}Bi ou l' ^{90}Y , couplé à la biotine est ensuite injecté, pour venir se lier à la streptavidine préalablement fixée à la tumeur. Une escalade de doses a été évaluée : 0-1,85-5,55-9,25 et 11,1 MBq (soit 0-50-150-250 et 350 μCi) pour le ^{213}Bi et 0-3,7-6,5 et 9,25 MBq (soit 0-100-175-250 μCi) pour l' ^{90}Y . Les résultats ont confirmé l'efficacité supérieure du ^{213}Bi pour une activité de 9,25 MBq (250 μCi), l' ^{90}Y ayant des effets toxiques significatifs (Zhang, Yao et al. 2002). Une étude similaire a donné des résultats comparables en utilisant le fragment ScFv de l'anticorps dirigé contre le CD25 (Zhang, Zhang et al. 2003).

Enfin, une comparaison entre l'efficacité thérapeutique de l'astate 211 (^{211}At) et de l'iode 131 (^{131}I), dans un modèle de xénogreffe de carcinome ovarien humain a été réalisé chez la souris *nude* préalablement greffée par la lignée NIH : OVCAR3, par voie intra-

péritonéale. L'anticorps Mov18, anticorps dirigé contre l'isoforme α du récepteur aux folates, administré par voie intra-péritonéale et couplé à l'un de ces deux radionucléides, a montré une plus grande efficacité de l' ^{211}At pour une irradiation équivalente de la moelle osseuse (Anderson and Palm 2001).

5. Les indications thérapeutiques de la RIT

Radioimmunothérapie α et β possèdent des propriétés physiques différentes, il est donc aujourd'hui possible d'adapter le rayonnement en fonction des caractéristiques d'une tumeur donnée. Les particules α seront utilisées dans le traitement des formes disséminées, comme les leucémies, les micrométastases dans le cadre de la maladie résiduelle post-chirurgicale. L'utilisation des émetteurs β est actuellement réservée au traitement des tumeurs solides. L'efficacité de la RIT est aujourd'hui démontrée en hématologie, mais elle reste à confirmer pour les tumeurs solides (Goldenberg 2002; Chatal 2006a). Il est maintenant clairement établi que l'approche thérapeutique est d'autant plus efficace qu'elle est mise en place chez des patients présentant une petite masse tumorale, idéalement à un stade de maladie résiduelle, c'est-à-dire un stade très précoce de récurrence ou dans une situation clinique de rémission complète après traitement. La distribution tumorale de l'anticorps monoclonal radiomarqué est alors supérieure et plus homogène, les cellules moins hypoxiques et plus radiosensibles. La RIT est une modalité de traitement intéressante, car elle est bien adaptée au ciblage systémique de petits reliquats tumoraux et permet d'induire des lésions y compris dans le compartiment des cellules souches (quiescentes, en G0) contrairement aux substances utilisées en chimiothérapie qui n'agissent que sur les cellules en cycle. Les études en cours évaluent particulièrement la RIT en consolidation après un traitement initial de référence (Press, Unger et al. 2003; Liersch, Meller et al. 2005).

La RIT alpha présente également un intérêt dans les protocoles de conditionnement qui précèdent une greffe de moelle osseuse (Liu, Eary et al. 1998; Press, Eary et al. 2000; Gopal, Rajendran et al. 2007).

IV. Les aspects radiobiologiques de la RIT

En radiothérapie externe, l'irradiation est délivrée sous forme fractionnée, avec des activités intermittentes et des débits de doses élevés (de l'ordre de 60 Gy/h). La radiothérapie vectorisée constitue une modalité d'irradiation radicalement différente, considérée comme une technique d'irradiation à bas débit de dose. D'un point de vue radiobiologique, la délivrance d'une irradiation continue prolongée à bas débit de dose n'a pas les mêmes effets qu'une irradiation intensive (Kassis and Adelstein 2005).

1. Les effets cellulaires

L'exposition d'une cellule aux rayonnements ionisants peut avoir plusieurs conséquences. Il est unanimement admis que l'ADN, en tant que support de l'information génétique, constitue la cible principale. La lésion élémentaire directe que peut subir la molécule d'ADN est la cassure d'un des deux brins ou cassure simple brin. Cet événement existe naturellement au sein des cellules. Les mécanismes de réparation des cassures simple brin permettent la plupart du temps dans des conditions naturelles d'irradiation, de restituer l'intégrité de l'ADN cellulaire, notamment grâce à la persistance du brin complémentaire d'ADN, servant de matrice pour la restitution de la séquence du brin portant la cassure. Dans des conditions d'irradiation intensive, l'accumulation de ces cassures simple brin conduit à des lésions plus complexes plus ou moins intenses avec cassure des deux brins et peut aboutir à des mutations ponctuelles entraînant la mort de la cellule irradiée ou de sa descendance (mort mitotique). L'irradiation par des particules β , des rayonnements X ou γ produit majoritairement des cassures simple brin. Cependant, quelque soit le type de rayonnements considérés, la densité des lésions observée dans un faible volume, conditionne la complexité des lésions induites.

Les rayonnements particulaires comme les particules α possédant un fort TEL induisent le plus souvent des cassures des deux brins complémentaires de l'ADN (cassure double brin). Il est à noter que la cassure des deux brins complémentaires à proximité l'une de l'autre est un événement rare dans des conditions d'irradiation naturelle. Des mécanismes

moléculaires, distincts de ceux impliqués dans la réparation des cassures simples, sont capables de relier les extrémités des molécules d'ADN rompues. Ces réparations sont néanmoins beaucoup moins fidèles que celles des cassures simple brin et induisent fréquemment des mutations de gènes pouvant conduire, en fonction de leur nombre et de leur localisation, à la mort cellulaire ou à leur transformation. L'effet des rayonnements ionisants sur l'ADN peut être direct ou indirect. L'irradiation des molécules d'eau conduit en effet, à la formation de radicaux libres eux-mêmes, capables d'induire des modifications et des cassures de l'ADN par effet indirect (figure 3).

Au cours du cycle cellulaire, la transition G1-S, la phase S et la transition G2-M sont des étapes particulièrement radiosensibles dans la vie d'une cellule (Pouget and Mather 2001). Quelque soit le type de lésions, par effet direct ou indirect, les mécanismes de réparation sont activés mais lorsque le nombre de ces lésions est trop important, la machinerie cellulaire est submergée et des réparations non conformes à l'original (mutations létales ou non) peuvent apparaître. La plupart du temps ces lésions de l'ADN conduisent à la mort cellulaire par apoptose ou par mort mitotique. Dans de rares cas, cette mutation pourra progressivement mener la cellule vers un processus cancéreux (dérégulation de la prolifération, immortalisation et inactivation de l'apoptose). Lorsque les réparations sont suffisamment rapides et fidèles (faibles densités des lésions), la voie apoptotique est inhibée avant d'avoir atteint son point de non-retour. A l'inverse, en cas de dommages étendus, la voie apoptotique peut aboutir à la destruction de la cellule avant que l'ADN ne soit réparé. Il faut ajouter que le risque de réparation infidèle dépend aussi de la densité des radiolésions. Par conséquent, l'entrée en apoptose est un mécanisme de sauvegarde cellulaire diminuant le risque que le génome endommagé soit transmis à la descendance.

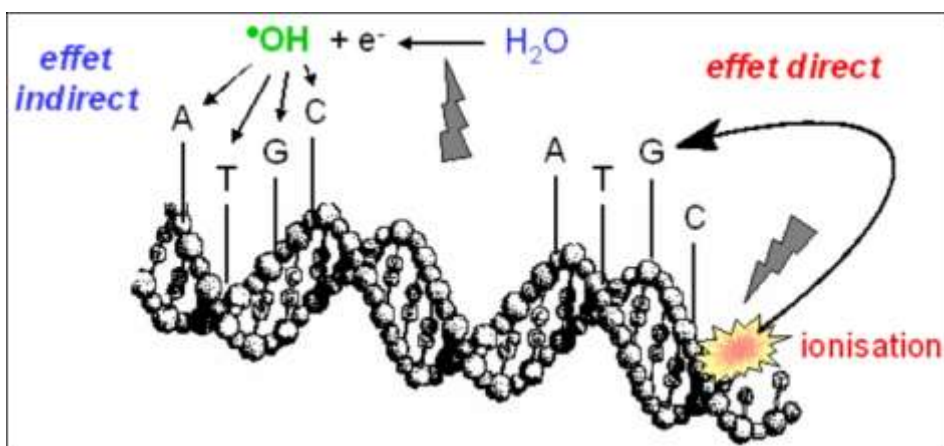


Figure 3. Effets directs et indirects des rayonnements ionisants.

(D'après Thierry Douki et Jean-Luc Ravanat- Laboratoire des lésions des acides nucléiques-LAN)

2. Les effets tissulaires

Les tissus étant constitués de cellules, la perte cellulaire consécutive à une irradiation va entraîner certaines conséquences fonctionnelles variables selon le degré de différenciation des cellules atteintes. Ainsi, les tissus compartimentaux, comme la peau, l'intestin ou la moelle osseuse sont relativement radiosensibles. En effet, ce type de tissus contient un compartiment de cellules souches pluripotentes (non différenciées), un compartiment intermédiaire de maturation (amplification des cellules) et un comportement fonctionnel (cellules différenciées). Dans ce type de tissus, le flux cellulaire va toujours des cellules souches vers le compartiment fonctionnel. Les dommages causés par l'irradiation de ce type de tissus sont à l'origine des effets déterministes car prévisibles de l'irradiation des cellules souches (hémorragie digestive, aplasie médullaire, brûlure radiologique). Le délai d'apparition de ces effets est proportionnel au temps nécessaire à la maturation des cellules souches.

Lorsque l'irradiation (pour des activités plus faibles) ne provoque pas la mort de la cellule, les mutations engendrées peuvent rester quiescentes et conduire, dans un temps indéfini, la cellule vers un processus cancéreux. Il s'agit d'un facteur de risque à survenue aléatoire, effet stochastique, indépendant de l'activité (figure 4). Le cancer peut également être provoqué par de fortes irradiations de l'organisme, on parle alors de cancers radio-induits.

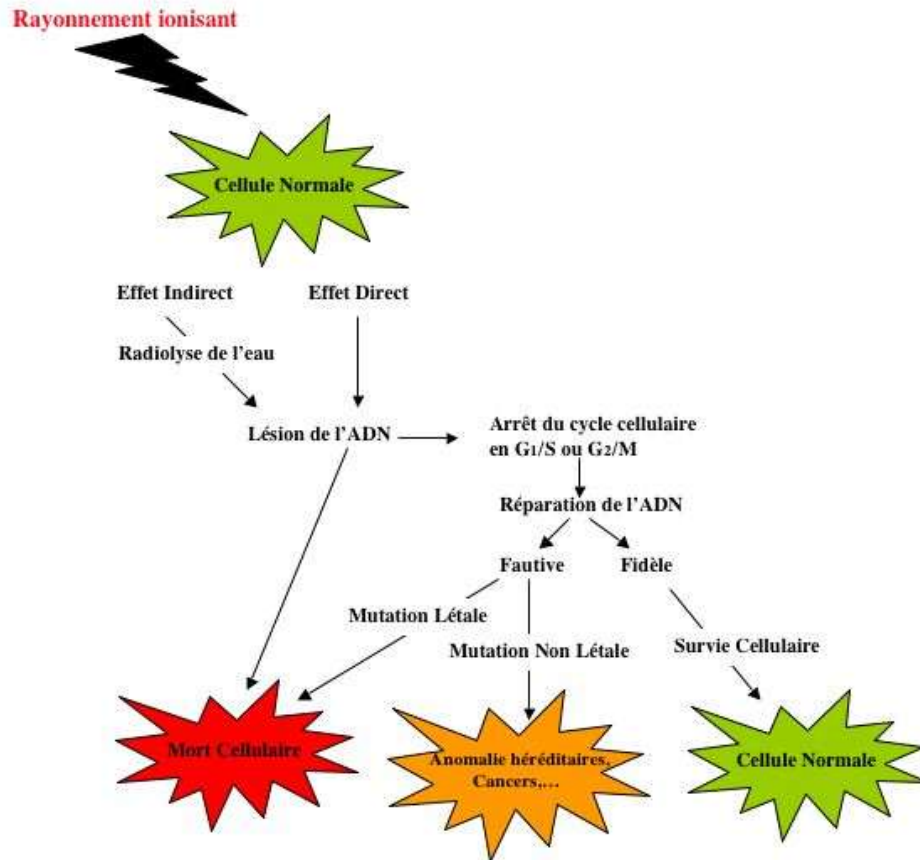


Figure 4. Conséquences des effets des rayonnements ionisants.

V. Les radioéléments β

1. Les principaux émetteurs de particules β

La majorité des protocoles mis en place actuellement utilise des émetteurs de particules β tels que l' ^{131}I ou l' ^{90}Y . Le lutétium 177 (^{177}Lu), le rhénium 186 ou 188 ($^{186/188}\text{Re}$) possèdent également des propriétés intéressantes pour la RIT des tumeurs solides mais leur potentiel thérapeutique reste à prouver. Le tableau 1 résume les propriétés physiques et chimiques des différents radioéléments présentant un intérêt pour la RIT β . Nous développerons dans cette partie uniquement l' ^{131}I , étudié au cours de mon travail de thèse, l' ^{90}Y dont les applications cliniques sont reconnues et le cuivre 67 (^{67}Cu), dont l'intérêt est grandissant.

a. L'iode 131 (^{131}I)

^{131}I est le radionucléide le plus utilisé en RIT β , notamment dans le traitement du cancer de la thyroïde. Il émet un rayonnement β sur un parcours de l'ordre de 0,36 mm et possède une demi-vie de 8 jours. Les caractéristiques de ^{131}I ne sont pas optimales, en particulier à cause d'une composante abondante d'irradiation gamma énergétique (364,7 keV) qui participe peu à l'efficacité thérapeutique, mais contribue à l'irradiation indésirable des tissus normaux du malade et du personnel soignant environnant. Cette composante γ permet d'utiliser ^{131}I en tant que traceur pour l'imagerie. Sa manipulation reste toutefois délicate et exige une radioprotection importante pour le personnel soignant (Carrasquillo, White et al. 1999).

b. L'yttrium 90 (^{90}Y)

^{90}Y est un émetteur β pur, obtenu par décroissance du strontium 90, il ne possède pas d'émission γ associé, ce qui facilite sa manipulation. Il peut être ainsi considéré comme une alternative à l'utilisation de ^{131}I . En contrepartie, les études d'imagerie et de dosimétrie doivent être réalisées à l'aide d'un autre radioélément. L'indium 111 (^{111}In) est utilisé, bien qu'il ait été démontré que sa biodistribution ne soit pas exactement identique à celle de ^{90}Y , avec notamment une sous estimation de la dose de radioactivité à la moelle osseuse. ^{90}Y est cinq fois plus énergétique que ^{131}I , et possède un trajet situé entre 100 et 200 diamètres cellulaires (5,3 mm en moyenne). ^{90}Y possède une demi-vie de 2,67 jours, suffisante pour permettre la distribution des anticorps entiers à la tumeur, qui se concentrent à ce niveau en 2 à 3 jours. Cependant, ^{90}Y ayant une forte affinité pour l'os lorsqu'il se trouve sous forme libre, la dose reçue par la moelle osseuse peut augmenter de façon considérable (Carrasquillo, White et al. 1999).

c. Le cuivre 67 (^{67}Cu)

Le cuivre 67 possède une période physique de 2,58 jours, tout comme ^{90}Y , suffisante pour permettre la distribution des anticorps entiers à la tumeur, et permettant d'obtenir une dose relative à la tumeur plus élevée que celle pouvant être obtenue avec ^{131}I (Smith,

Alberto et al. 1993; Novak-Hofer, Zimmermann et al. 1997). Le parcours d'émission du ^{67}Cu s'effectue sur 0,2mm, il est donc adapté au traitement de petites tumeurs ne dépassant pas 5 mm de diamètre. Le ^{67}Cu émet également des irradiations γ , dans une moindre proportion que l' ^{131}I (49% versus 90%). Cependant, la demi-vie de l' ^{131}I (8 jours) étant 3 fois plus élevée que celle du ^{67}Cu (2,58 jours), nous pouvons supposer que le ^{67}Cu puisse émettre trois fois plus de radiations γ que l' ^{131}I au cours de sa désintégration. Ces émissions seront tout comme l' ^{131}I , adaptées au diagnostic pré-thérapeutique par imagerie (Novak-Hofer and Schubiger 2002). Le ^{67}Cu est produit à partir d'un accélérateur de particules (cyclotron) ayant pour cible un atome de Zinc 68 (Mausner, Kolsky et al. 1998).

Radionucléide	$t_{1/2}$ (h)	Rayonnement imagerie	Rayonnement RIT	Distance parcourue (mm) rayonnements β	E_{β} (keV)	E_{γ} (keV)	Produit
^{90}Y	64,08	/	β^-	3,78	934,8	/	^{90}Sr / générateur $^{89}\text{Y}(\text{n}, \gamma) ^{90}\text{Y}$
^{131}I	192,96	γ	β^-	0,36	181,7	364,5	$^{131}\text{Te}(\text{n}, \gamma) ^{131}\text{I}$
^{177}Lu	161,04	γ	β^- EC	0,22 <0,02	133	208,4 113	$^{176}\text{Lu}(\text{n}, \gamma) ^{177}\text{Lu}$
^{67}Cu	61,92	γ	β^- EC	0,24 <0,02	141	184,6 93,3	$^{68}\text{Zn}(\text{p}, 2\text{p}) ^{67}\text{Cu}$ $^{67}\text{Zn}(\text{n}, \text{p}) ^{67}\text{Cu}$
^{186}Re	90,64	γ	β^- EC	0,98 <0,02	349,3	137,1 122,3	$^{185}\text{Re}(\text{n}, \gamma) ^{186}\text{Re}$
^{188}Re	16,98	γ	β^- EC	2,91 <0,02	764,2	155 633,1	^{188}W /générateur $^{187}\text{Re}(\text{n}, \gamma) ^{188}\text{Re}$
^{212}Pb	10,64	γ	β^- EC	0,13 <0,02	99,4	238,6	^{224}Ra /générateur

Tableau 1. Principaux radioéléments bêta utilisés en clinique et leurs caractéristiques physico-chimiques.

(D'après Boswell et al. 2007)

DOTA : 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid ;

TETA : 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid ;

MAG3 : Mercaptoacetylglycylglycylglycine

2. Les cibles thérapeutiques des rayonnements β

Plus de 100 protocoles cliniques de radioimmunothérapie ont été réalisés. Les émetteurs β sont utilisés avec succès dans les applications thérapeutiques, notamment dans le traitement des pathologies hématologiques malignes (leucémies et lymphomes) et dans une moindre mesure, dans le traitement des tumeurs solides de petites tailles, dans la prise en charge de la maladie résiduelle ou des micrométastases. L'efficacité de la RIT β dans le traitement des tumeurs solides, primaires et plus volumineuses reste à démontrer (Goldenberg 2002; Chatal 2006a).

a. RIT β et traitement des tumeurs hématologiques

L'efficacité de la RIT a d'abord été démontrée dans le traitement du LNH. Il s'agit d'une tumeur radiosensible, se présentant sous forme d'amas cellulaires et exprimant de fortes densités d'antigènes dont l'expression est restreinte aux lymphocytes. Les cellules de lymphomes sont plus accessibles aux anticorps que les cellules de tumeurs solides. Cette maladie répond à l'immunothérapie passive avec des anticorps non radiomarqués. Cette pathologie est donc un très bon candidat pour la RIT. Par ailleurs, les patients atteints de LNH sont immunodéprimés, ce qui permet de réaliser des injections d'anticorps répétées. Le couplage de ces anticorps à des radioéléments permet également d'augmenter l'efficacité du traitement (Bodet-Millin, Salun et al. 2008). Les principales cibles de la RIT β dans le cadre du traitement des lymphomes et leucémies sont le CD20, le CD22, le CD33, et la molécule HLA-DR10. Le tableau 2 résume les principales études réalisées.

- **Le ciblage de l'antigène CD20**

La molécule CD20 (antigène B1) est exprimée par plus de 95% des cellules B de lymphomes et sur les cellules normales des patients traités. 5% de ces cellules restent donc inaccessibles à la RIT (Stashenko, Nadler et al. 1980). Il est fixé à la membrane cellulaire, et présent en très faibles quantités dans le sérum sous forme soluble. Il joue probablement un rôle important dans l'activation et la régulation du cycle cellulaire des cellules B (Nadler, Stashenko et al. 1980; Tedder, Boyd et al. 1985). Le premier anticorps monoclonal utilisé

dans la thérapie contre le cancer et ayant été approuvé par la US FDA (Food and Drug Administration) pour le traitement du lymphome B de bas grade récidivant ou réfractaire, est le rituximab (Leget and Czuczman 1998). Il s'agit d'un anticorps monoclonal chimérique murin/humain d'isotype IgG1 κ , qui reconnaît spécifiquement l'antigène CD20 avec une très haute affinité. Dans un essai clinique de phase II sur des patients atteints de LNH de bas grade en rechute, l'utilisation du rituximab a entraîné 48% de réponses, dont 6% de réponses complètes. La durée moyenne de cette réponse est de 12 mois (McLaughlin, Grillo-Lopez et al. 1998). Le rituximab induit la mort des cellules cibles par des mécanismes d'ADCC, CDC, et apoptose (Marcus and Hagenbeek 2007).

L'amélioration de l'efficacité thérapeutique du rituximab peut être obtenue, lorsqu'il est couplé à un radioélément, comme l' ^{90}Y ou l' ^{131}I . L'anticorps d'origine murine a ainsi été couplé à l' ^{90}Y pour former le premier anticorps radiomarqué utilisé en radioimmunothérapie des cancers. Approuvé par la FDA en 2002, son nom commercial est le Zévalin[®] (ou ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan). De nombreux essais cliniques ont été menés chez l'adulte, atteint d'un LNH à cellule B positif, de type folliculaire en rechute ou réfractaire après traitement par le rituximab. Des essais cliniques de phase II indiquent que l' ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan permet d'obtenir des taux de rémissions complètes variant de 62 à 80%, lorsqu'il est donné en première intention dans le traitement du lymphome folliculaire ou en seconde ligne après chimiothérapie avec ou sans rituximab (Zinzani, d'Amore et al. 2008).

Un second anticorps utilisable en RIT β a été approuvé en 2003 par la FDA pour le traitement des formes réfractaires et résistantes au rituximab de LNH. Le tositumomab, appelé aussi "anti-B1", est une IgG2a murine. L'épitope du CD20 reconnu par cet anticorps est différent de celui reconnu par le rituximab. Cet anticorps est radiomarqué par l' ^{131}I (131-tositumomab, Bexxar[®]). Les essais cliniques de phase I et II ont montré des résultats impressionnants, avec des taux de réponses générales variant entre 50 et 70% dont 20 à 33% de réponses complètes, avec un allongement de la durée de réponse de 20 à 30 mois pour des patients devenus résistants au rituximab (Press, Eary et al. 1995; Kaminski, Zasadny et al. 1996; Kaminski, Zelenetz et al. 2001; Bennett, Kaminski et al. 2005).

En l'absence d'essais randomisés, il est difficile de comparer l'efficacité et la toxicité du Zevalin[®] et du Bexxar[®]. Néanmoins, les données de la littérature montrent des taux de réponses et un allongement de la durée de vie comparables, bien que le Zevalin[®] semble être moins toxique que le Bexxar[®] (Jacene, Filice et al. 2007).

• Le ciblage de l'antigène CD22

Bien que les anticorps spécifiques de la molécule CD20 soient désormais validés pour le traitement du LNH, d'autres anticorps sont actuellement développés afin de compléter l'arsenal thérapeutique. Des résultats encourageants ont été obtenus avec un anticorps couplé à l' ^{131}I ou l' ^{90}Y et dirigé contre la molécule CD22. L'épratuzumab ou hLL2 est le premier anticorps humanisé développé dans la thérapie du LNH (Leung, Goldenberg et al. 1995). Il se fixe principalement à la surface des cellules cancéreuses des patients atteints de LNH, puis est rapidement internalisé. Des études précliniques ont prouvé une meilleure biodistribution à la tumeur de l'anticorps couplé à l' ^{90}Y qu'avec la forme couplée à l' ^{131}I (Juweid, Stadtmauer et al. 1999). Ces études ont montré également la plus grande stabilité du complexe. Contrairement au Zevalin[®] et au Bexxar[®], qui sont des anticorps murins radiomarqués, l'humanisation de l'anticorps hLL2 limite son immunogénicité, et permet de répéter les doses administrées. Plusieurs études de phase I/II sont menées afin d'évaluer la pertinence de l'anticorps marqué à l' ^{90}Y (Linden, Hindorf et al. 2005) ou au ^{186}Re (Postema, Raemaekers et al. 2003). Une étude comparative entre le ^{131}I -Rituxan et le hLL2 montre que différents radioéléments peuvent être efficaces dans le traitement du LNH (^{131}I , ^{90}Y , ^{186}Re), même s'il n'est pas encore possible de déterminer le radioélément le mieux adapté (Silverman, Delpassand et al. 2004).

• Ciblage de la molécule HLA-DR10

Le premier essai clinique de RIT du LNH réfractaire ou résistant a été réalisé en 1987 par l'équipe de DeNardo (DeNardo, DeNardo et al. 1987; DeNardo, DeNardo et al. 1988), avec l'anticorps murin Lym-1 (IgG2a) couplé à l' ^{131}I et reconnaissant un épitope de la sous-unité β de la molécule HLA-DR10. Les taux de réponses étaient de 50%. Cet anticorps a ensuite été validé dans des essais cliniques, couplé au ^{67}Cu , avec un taux de réponse général de 58% (DeNardo, DeNardo et al. 2000). Le même groupe a également testé la toxicité et l'efficacité du traitement avec l'anticorps couplé à l' ^{131}I , sur 30 patients présentant une pathologie réfractaire au traitement standard (dont 25 LNH et 5 leucémies lymphoïde chronique - LLC). Les patients ont été traités avec de faibles doses fractionnées (DeNardo, DeNardo et al. 1998). 57% des patients ont répondu au traitement de façon durable avec une toxicité acceptable. Une réponse HAMA induite par l'administration de l'anticorps murin est observée chez 28% des patients traités et induit un arrêt du traitement dans seulement 14%

des cas. Il est intéressant de noter que la survie des patients ayant une réponse HAMA est plus longue (18 mois versus 9 mois). La réponse HAMA pourrait donc contribuer à la réponse anti-tumorale. Le groupe de DeNardo a émis l'hypothèse selon laquelle l'activation d'une réponse anticorps anti-idiotype en cascade pourrait être à l'origine de cet effet. Cette réponse anticorps pourrait également s'expliquer par le développement d'une réponse immune anti-tumorale induite par la RIT (DeNardo, Bradt et al. 2003)

- **Ciblage de la molécule CD33**

La molécule CD33 est également ciblée en RIT β dans le traitement des leucémies myéloïdes. L'anticorps murin M195 (IgG2a), cible la molécule CD33, glycoprotéine de surface exprimée sur la plupart des cellules leucémiques myéloïdes ainsi que sur les cellules progénitrices myélomonocytaires, elle est absente des cellules souches hématopoïétiques normales, granulocytes matures, et des cellules des tissus non hématopoïétiques (Tanimoto, Scheinberg et al. 1989). L'origine murine de l'anticorps peut être à l'origine du développement d'une réponse HAMA qui limite son efficacité (Scheinberg, Lovett et al. 1991). L'humanisation de cet anticorps (HuM195) permet de contourner ce problème.

L'anticorps HuM195 humanisé est utilisé dans des protocoles de conditionnements qui précèdent une greffe de moelle osseuse, chez des patients atteints de leucémie myéloïde avancée. La faisabilité de cette approche a été démontrée sur 19 patients atteints de leucémie myéloïde (Burke, Caron et al. 2003), en attente d'une transplantation allogénique. Le radioimmunoconjugué, formé par l'anticorps humanisé et couplé à 1^{131}I a été administré, associé au busulfan et au cyclophosphamide. Cette association permet d'éliminer les cellules leucémiques avant de réaliser la greffe de moelle osseuse.

b. RIT β des tumeurs solides et de la maladie résiduelle

- **Le traitement des tumeurs solides par RIT β**

Si l'intérêt thérapeutique de la RIT β pour les tumeurs hématologiques a été démontré, il reste à confirmer pour les tumeurs solides. L'absence de résultats s'explique en partie par l'importance des masses tumorales et leur radiorésistance qui ne permettent pas de délivrer des doses toxiques à la tumeur, tout en conservant une irradiation acceptable au niveau des

tissus sains. Seuls les cancer du sein, de la prostate, des ovaires, de la thyroïde ou du colon ont fait l'objet d'études cliniques, dans ce cadre. Il existe de nombreux antigènes spécifiques de ces adénocarcinomes, tels que l'antigène carcino embryonnaire (ACE), la glycoprotéine associée aux tumeurs (TAG-72), l'antigène membranaire spécifique de la prostate (PSMA), ou le récepteur pour les facteurs de croissance épidermiques humains (HER2). Ces antigènes sont utilisés en clinique pour l'immunodiagnostic, leur application en RIT bêta reste à démontrer. En effet, l'essentiel des études cliniques de phase I/II publiées utilisant l'¹³¹I ou l'⁹⁰Y n'a pas prouvé son efficacité (Behr and Sharkey 1997; Ychou and Pelegrin 1998).

- **Le traitement de la maladie résiduelle par RIT β**

Plusieurs études confirment que la captation d'un anticorps est inversement proportionnelle au volume d'une tumeur, essentiellement pour des raisons de vascularisation et de mobilité des anticorps dans le liquide interstitiel (Bardies, Thedrez et al. 1992; Vogel, Galmiche et al. 1997). Des résultats encourageants ont été observés sur des tumeurs de petite taille, et dans la maladie résiduelle microscopique des adénocarcinomes ovariens (Mahe, Fumoleau et al. 1999; Alvarez, Huh et al. 2002). L'approche thérapeutique est d'autant plus efficace qu'elle est mise en place chez des patients présentant une petite masse tumorale, idéalement à un stade de la maladie résiduelle. La distribution tumorale de l'anticorps monoclonal radiomarké est alors supérieure et plus homogène, les cellules sont moins hypoxiques et donc plus radiosensibles. Les études en cours évaluent particulièrement la RIT des tumeurs solides en consolidation après un traitement initial de référence (Press, Unger et al. 2003; Liersch, Meller et al. 2005). Cette approche a été évaluée dans des études cliniques de phase I/II utilisant un anticorps bispécifique anti-ACE x anti- DTPA par une approche en 2 temps et un haptène marqué à l'iode 131, avec des résultats thérapeutiques intéressants. En effet, de bons résultats ont été obtenus dans le cancer médullaire de la thyroïde et dans le cancer du poumon à petites cellules, avec cette stratégie (Kraeber-Bodere, Faivre-Chauvet et al. 1999; Vuillez, Kraeber-Bodere et al. 1999).

Référence bibliographique	Antigène ciblé	Ac/origine	Radioéléments associés	Phase clinique	Taux de réponses
Zinzani (2008)¹	CD20	ibritumomab/murine (IgG1)	⁹⁰ Y	II	62-80%
Bennett (2005)² Kaminski (2001/1996)³ Press (1995)⁴		Tositumomab/murine (IgG2a)	¹³¹ I	I/II	50 et 70%
Vose (2000)⁵	CD22	mLL2/murine (IgG2a)	¹³¹ I	I/II	33%
Postema (2003)⁶		epratuzumab (hLL2)/humanisé (IgG1)	¹⁸⁶ Re	I	-
Linden (2005)⁷			⁹⁰ Y	I/II	62%
DeNardo (1987/1988)⁸	HLA-DR10	Lym-1/murine (IgG2a)	¹³¹ I	I	50%
DeNardo (2000)⁹			⁶⁷ Cu		58%
Schwartz (1993)¹⁰	CD33	M195/murine (IgG2a)	¹³¹ I	I	-
Jurcic (1995)¹¹		HuM195/humanisé (IgG1)	¹³¹ I		
Jurcic (2000)¹²		HuM195/humanisé (IgG1)	⁹⁰ Y		

Tableau 2. RIT β des tumeurs hématologiques : bilan des études cliniques

¹(Zinzani, d'Amore et al. 2008) ; ²(Bennett, Kaminski et al. 2005) ; ³(Kaminski, Zasadny et al. 1996; Kaminski, Zelenetz et al. 2001) ; ⁴(Press, Eary et al. 1995) ; ⁵(Vose, Colcher et al. 2000) ; ⁶(Postema, Raemaekers et al. 2003) ; ⁷(Linden, Hindorf et al. 2005) ; ⁸(DeNardo, DeNardo et al. 1987; DeNardo, DeNardo et al. 1988) ; ⁹(DeNardo, DeNardo et al. 2000) ; ¹⁰(Schwartz, Lovett et al. 1993) ; ¹¹(Jurcic, Caron et al. 1995) ; ¹²(Jurcic, DeBlasio et al. 2000)

VI. Les radioéléments α

Il existe approximativement une centaine de radioéléments émetteurs de particules alpha, pour la plupart des noyaux lourds de numéro atomique supérieur à 82, cependant seul un nombre réduit de ces radioéléments est disponible pour une utilisation clinique éventuelle (Couturier, Supiot et al. 2005; Mulford, Scheinberg et al. 2005). Les radioéléments utilisables en RIT alpha doivent avoir une période courte (maximum quelques jours), et décroître vers des radioéléments stables ou possédant une demi-vie courte. Il faut être en mesure de purifier les isotopes utilisables en thérapie avec une pureté radiochimique acceptable. Enfin ces radioéléments doivent pouvoir être couplés à un anticorps dans un temps compatible avec leur période radioactive et avec une bonne stabilité en milieu sérique.

Les radionucléides qui présentent des caractéristiques favorables à une application en RIT sont le bismuth 212 et 213, l'astate 211, l'actinium 225, le plomb 212 et le radium 223. Nous développerons dans ce chapitre uniquement le bismuth 213, l'astate 211 faisant l'objet de mon travail de thèse et l'actinium 225, nous permettant d'obtenir le bismuth 213.

1. Le bismuth 213 (^{213}Bi)

a. Propriétés physico-chimiques

Le ^{213}Bi reste l'émetteur de particules alpha le plus répandu actuellement. Il est facile à obtenir, en raison d'une production possible à partir d'un générateur d'actinium 225 (^{225}Ac). Cependant, les quantités obtenues actuellement restent insuffisantes pour envisager des essais cliniques à grande échelle. Il possède des caractéristiques physico-chimiques similaires à celles du ^{212}Bi . Il décroît à partir de l' ^{225}Ac en émettant 1 particule α et 2 particules β pour aboutir au ^{209}Bi stable. L'énergie maximale émise par la particule α est de 8,4 MeV, et représente 90,3 % de l'énergie émise totale. Les rayonnements γ émis au cours de la décroissance du ^{213}Bi peuvent être également utilisés pour les techniques d'imagerie ou de dosimétrie, avec une énergie moyenne de 440 keV (Sgouros, Ballangrud et al. 1999).

b. Les essais thérapeutiques

• Les données pré-cliniques

Concernant le ^{213}Bi , un système de micrométastases pulmonaires, a permis de démontrer le potentiel thérapeutique de ce radioisotope dans l'atteinte de la néo-vascularisation tumorale. En effet, un anticorps monoclonal (201B) dirigé contre les capillaires et vaisseaux pulmonaires (thrombomoduline) couplé au ^{213}Bi a été testé sur différentes lignées de cancer pulmonaire (dont la lignée EMT-6). Ces différentes lignées ont été injectées par voie intraveineuse chez la souris BALB/c pour venir ensuite former des micrométastases au niveau pulmonaire. Une réduction du volume tumoral a été observée pour l'ensemble des lignées testées après administration intraveineuse de 0,93 MBq (25 μCi) de ^{213}Bi couplé à l'anticorps 201B. Cet essai a mis en valeur l'importance du ciblage de l'environnement vasculaire tumoral (Kennel, Boll et al. 1999). Cependant, des cas d'insuffisance respiratoire ont été remarqués aux plus fortes activités (2,6-6,7 MBq soit 70-181 μCi). L'efficacité du ^{213}Bi a été également démontrée dans de nombreuses études par le groupe d'Allen, notamment dans le traitement du mélanome, de la leucémie, du cancer colorectal ou de la prostate. Récemment, la même équipe a déterminé l'efficacité et la toxicité du ^{213}Bi couplé au PAI2 (Plasminogen Activator Inhibitor Type 2). Le vecteur utilisé n'est pas un anticorps mais est un puissant inhibiteur de l'uPA (urokinase plasminogen activator), facteur de mauvais pronostic et associé au degré métastatique dans de nombreux cancers dont celui de la prostate. L'étude a été conduite chez la souris *nude* greffées par une lignée cellulaire de cancer prostatique métastatique (PC3) en sous-cutanée. L'administration du radiopharmaceutique a été réalisée en intra-péritonéal. Un ralentissement de la croissance tumorale pour les souris ayant reçu une activité unique de 947 MBq/kg (25 mCi/kg), et une régression tumorale pour les souris ayant reçu une activité supérieure de 1421 MBq/kg (38,4 mCi/kg), ont été constatés. L'administration répétée d'une dose de 189 MBq/kg (5,1 mCi/kg), une fois/j sur 5 jours consécutifs, permet d'obtenir une inhibition significative de la croissance tumorale (Abbas Rizvi, Li et al. 2006). Par ailleurs, la RIT locorégionale du cancer gastrique disséminé a montré des résultats très encourageants avec le ^{213}Bi . Cet essai a été réalisé sur la souris *nude* préalablement greffée par voie intra-péritonéale par une lignée cellulaire de cancer gastrique humaine (HSC45-M2). Dans ce cadre des injections répétées intra-péritonéales de 0,37 MBq (10 μCi) de ^{213}Bi couplé à l'anticorps d9Mab, spécifique de l'E-cadherine d9, à 8 jours d'intervalle (J1 et J8) augmente considérablement la médiane de

survie par rapport à celle du groupe témoin (84 jours pour le groupe traité versus 22 jours pour le groupe témoin) (Bloechl, Beck et al. 2005).

- **Les données cliniques**

Le ciblage de la molécule CD33 à l'aide de l'anticorps HuM195 en RIT alpha a permis d'obtenir des résultats pertinents durant les essais pré-cliniques. La première étude chez l'homme a été réalisée par l'équipe de Jurcic au centre anti-cancéreux du Mémorial de Sloan-Kettering (New-York). Dix-huit patients atteints d'une leucémie myéloïde aigue ou chronique récidivante, ont été traités avec l'anticorps HuM195 couplé au ^{213}Bi suivant une escalade de doses partant de 10,36 à 37 MBq/kg (0,28 à 1 mCi/kg). Les techniques d'imagerie ont permis de mettre en évidence une fixation rapide du radioconjugué au niveau de la moelle osseuse, du foie et de la rate. Malgré une myélosuppression observée pour l'ensemble des patients, ainsi qu'un dysfonctionnement des fonctions hépatiques pour 22% des patients évalués, les doses administrées ont permis de montrer l'activité anti-leucémique de ce radioconjugué avec une réduction des blastes circulants chez 93% des patients traités aux plus fortes doses (25,9 MBq/kg ou 700 $\mu\text{Ci/kg}$ et 37 MBq/kg ou 1mCi/kg). Cependant aucune rémission complète n'a été observée, soulignant la difficulté du ciblage (Jurcic, Larson et al. 2002).

Une seconde étude a été réalisée par l'équipe d'Allen en 2005, chez 16 patients atteints d'un mélanome métastatique à l'aide de l'anticorps murin 9.2.27 dirigé contre le MCSP (*Melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan*) et couplé au ^{213}Bi . L'objectif de cette étude était de tester la faisabilité d'un traitement intra-lésionnel, sur des tumeurs ayant des volumes compris entre 22 et 1016 mm³, en évaluant une gamme de doses partant de 5,5 MBq à 50 MBq (149 μCi à 1,35 mCi). Les résultats montrent que cette thérapie intra-lésionnelle permet de détruire l'ensemble des cellules tumorales à 16,7 MBq (450 μCi). Aucune réponse HAMA n'a été observée durant l'étude (Allen, Raja et al. 2005).

2. L'actinium 225 (^{225}Ac)

a. Propriétés physico-chimiques

L' ^{225}Ac peut être obtenu par décroissance naturelle de l'uranium 233 à partir de son noyau de filiation le thorium 229, ou à partir d'une irradiation neutronique de radium 226. Le thorium est considéré comme une source intarissable d' ^{225}Ac , en raison de sa durée de vie de 7340 années. La décroissance de l' ^{225}Ac conduit à l'émission de 4 particules α et 2 particules β , pour aboutir au ^{209}Bi stable. L'énergie maximale émise par les particules α est de 8,4 MeV et de 1,42 MeV pour les particules β (Kaspersen, Bos et al. 1995). Il existe actuellement 2 sources d' ^{225}Ac , celle du département de l'énergie américaine d'Oak Ridge (ORNC) et celle de l'institut des transuraniens de Karlsruhe en Allemagne (Apostolidis, Molinet et al. 2005). Sa demi-vie de 10 jours relativement longue permet son acheminement vers les centres de médecine nucléaire et les laboratoires biologiques.

Actuellement, les applications de ce radioélément consistent principalement à celles d'élément père, pour les générateurs de ^{213}Bi . En effet, malgré une demi-vie relativement longue par rapport au ^{213}Bi , l' ^{225}Ac va libérer dans le milieu 4 éléments de filiation, dont la demi-vie est très courte : Le francium 221 (4,8 min), l'astate 217 (0,032 sec), le bismuth 213 (45,6 min), et le polonium 213 (4,2 μs). La chélation de ces éléments fils constitue un problème majeur de toxicité. La cible antigénique doit être impérativement internalisée après fixation du radioimmunoconjugué, pour éviter la diffusion de ces éléments à l'extérieur du compartiment cellulaire, au niveau du foie et du squelette, pour lesquels ils possèdent un tropisme particulier (Davis, Glowienka et al. 1999 ; Miederer, Henriksen et al. 2008).

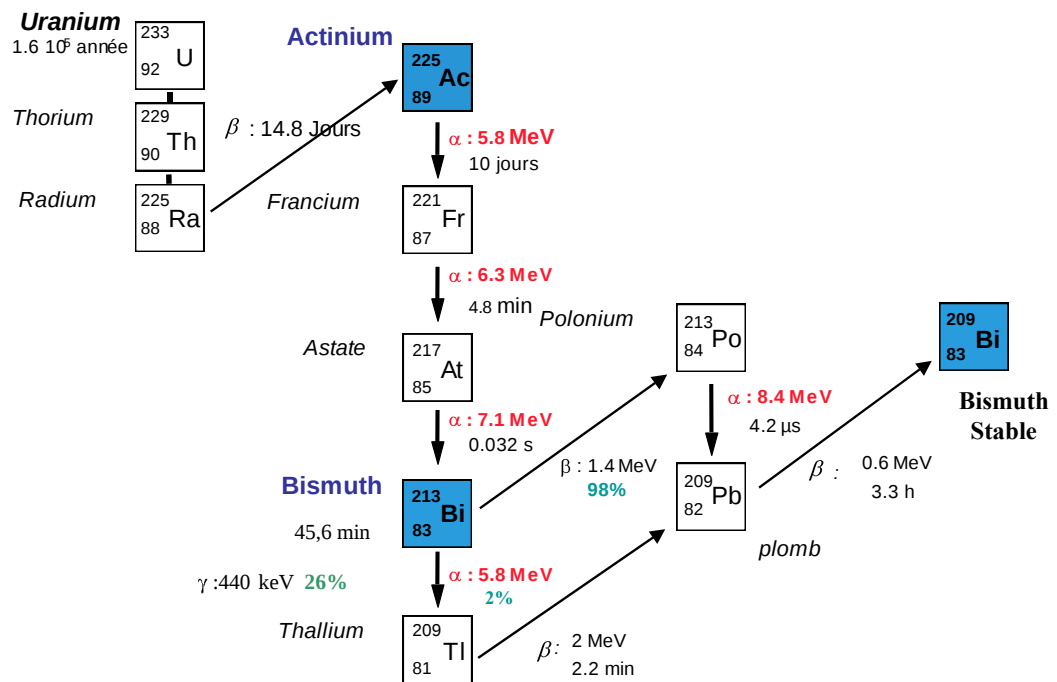


Figure 5. Schéma de décroissance de l'actinium 225 et du bismuth 213.

b. Les essais thérapeutiques

• Les données pré-cliniques

L'équipe du Memorial Sloan-Kettering a choisi d'utiliser directement l' ^{225}Ac en tant que générateur *in vivo* de rayonnements α , possédant une demi-vie plus longue que le ^{213}Bi , et libérant 4 particules α au cours de sa décroissance. L' ^{225}Ac a donc été couplé à l'acide 1,4,7,10-tetra-azacyclododecane-tetra-acétique ou DOTA, agent chélatant bifonctionnel (McDevitt, Ma et al. 2001; Miederer, Scheinberg et al. 2008) afin d'obtenir une complexation stable. Cette étude a permis de prouver l'efficacité de différents anticorps dirigés contre différents antigènes (de lymphomes, leucémie, cancer du sein, ovaire, neuroblastome et cancer de la prostate) couplé à l' ^{225}Ac par l'intermédiaire du DOTA (McDevitt, Ma et al. 2001). Le potentiel de ces radioconjugués est augmenté par la capacité des anticorps à être internalisés. En effet, Le contrôle des éléments de filiation de l' ^{225}Ac reste un problème majeur limitant son utilisation. Les particules alpha émises par le radionucléide doivent nécessairement passer par la cellule pour optimiser la toxicité intra-cellulaire et limiter ainsi

les émissions de particules alpha dans le milieu environnant. Cette contrainte est illustrée par une étude réalisée sur un modèle de neuroblastome, permettant d'évaluer le ciblage des cellules tumorales avec un anticorps spécifique de ganglioside GD2 (3F8) couplé à l' ^{225}Ac (Miederer, McDevitt et al. 2004). Les cellules humaines de neuroblastomes (NMB7) utilisées sont aussi sensibles aux radiations alpha que les cellules de lymphomes, de leucémies ou de cancer de la prostate. Malgré cette radiosensibilité, et la stabilité de l'anticorps ^{225}Ac -3F8 *in vitro* et *in vivo*, les résultats de thérapie obtenus chez le rat *nude* sont un peu décevants. Il n'y a pas de différences significatives entre la survie du groupe traité et le groupe témoin, ayant reçu le radioimmunoconjugué par voie intra-thécale. Ce manque d'efficacité peut être lié à l'absence d'internalisation du complexe radioconjugué-antigène, qui entraîne la libération des éléments de filiation de l' ^{225}Ac dans le milieu. Une étude menée chez la souris ciblant des cellules humaines de cancer ovarien par l'anticorps trastuzumab (anti-HER2/Neu) couplé à l' ^{225}Ac , a montré une internalisation de 50% des anticorps après deux heures. Dans ce cas, une prolongation significative de la survie des souris après l'injection intra-péritonéale de l'anticorps radiomarké a été observée pour des quantités d'anticorps qui n'entraînent pas de toxicité apparente (Borchardt, Yuan et al. 2003).

3. L'astate 211 (^{211}At)

a. Propriétés physico-chimiques

L' ^{211}At représente actuellement une alternative intéressante au ^{213}Bi , avec sa demi-vie de 7,2h. Son potentiel thérapeutique est reconnu depuis plus de 30 ans (Smit, Myburgh et al. 1973). L'astate est le radiohalogène le plus lourd sans isotope stable. Plus de 99% de l'énergie émise est due au rayonnement alpha. L' ^{211}At possède plusieurs caractéristiques physiques indispensables pour la RIT. Sa décroissance se fait par deux voies. La première voie de désintégration conduit à l'émission d'une particule α ayant une énergie de 5,87 MeV et conduit à la production de Bismuth 207 (42%), suivie d'une capture électronique conduisant au plomb 207 stable. La seconde voie conduit au Polonium 211 par capture électronique (58%), puis au plomb 207 stable par émission d'une particule α possédant une énergie de 7,45 MeV (Zalutsky and Vaidyanathan 2000; Zalutsky, Zhao et al. 2001). Le parcours tissulaire moyen de ces particules α est de l'ordre de 55-80 μm et la valeur moyenne du TEL est de l'ordre de 100 keV/ μm (Zalutsky and Bigner 1996). Le ^{211}Po , un de ses éléments de filiation,

émet des rayonnements d'une énergie suffisante pour une utilisation en imagerie (77-92 KeV) (Johnson, Turkington et al. 1995; Zalutsky and Bigner 1996).

L' ^{211}At est produit dans un cyclotron par bombardement d'une cible de bismuth 209 avec des particules α (Larsen, Wieland et al. 1996). L'énergie de ces particules α doit être contrôlée finement afin de minimiser la production de l'astate 210, possédant une demi-vie de 8,1 h, et lequel décroît vers le polonium 210, d'une demi-vie de 138 jours et possédant une forte toxicité médullaire.

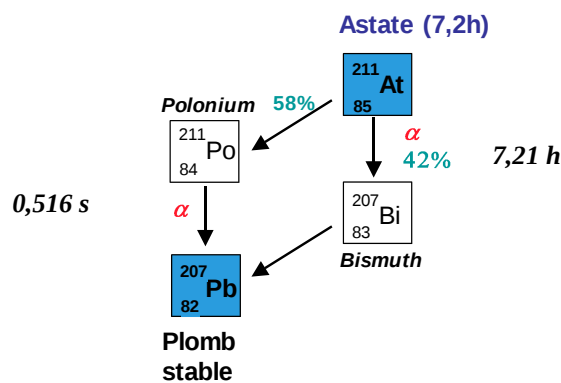


Figure 6. Schéma de décroissance de l'astate 211

b. Les essais thérapeutiques

• Les données pré-cliniques

L' ^{211}At est un émetteur α prometteur, mais son développement reste limité, compte tenu de sa faible disponibilité. Cependant, de nombreux anticorps sont en cours de développement avec des résultats très encourageants (pour revue Zalutsky, Reardon et al. 2007). Le premier exemple est une étude consacrée à l'évaluation d'un anticorps dirigé contre la sous-unité α du récepteur à l'IL-2 (CD25), le 7G7/B6 dans un modèle de lymphome. Les souris NOD/SCID ont été greffées par la lignée Karpas299, lignée de lymphome humain exprimant le CD25, par voie intraveineuse. Une activité de 0,555 MBq (15 μCi) d' ^{211}At couplé à l'anticorps 7G7/B6 ou 11F11, utilisé comme contrôle isotypique, a été administrée en intraveineux 7 jours après la greffe des cellules tumorales. La diminution de la concentration sérique de la forme soluble de la sous-unité α (IL-2Rs) permet d'évaluer l'efficacité du traitement. L'administration de l'anticorps spécifique permet d'inhiber significativement la croissance des cellules tumorales. Le taux d'IL-2Rs devient en effet

insignifiant pour le groupe ayant reçu l' ^{211}At couplé à l'anticorps spécifique, comparé aux groupes témoin n'ayant pas reçu de traitement (37,016 pg/ml) et le groupe ayant reçu l'anticorps non spécifique couplé à l' ^{211}At (5,796 pg/ml). Par ailleurs un allongement de la médiane de survie est constaté pour le groupe traité avec l'anticorps 7G7/B6 de manière significative par rapport aux deux groupes témoins. L'ensemble des animaux du groupe témoin meurt au bout de 46 jours, tandis que 33% des souris ayant reçu l'anticorps spécifique survivent plus de 5 mois. Cette étude a montré la spécificité et l'efficacité du traitement avec un allongement de la survie des animaux traités (Zhang, Yao et al. 2006).

Récemment l'équipe de Robinson a décrit une étude évaluant le potentiel thérapeutique d'une forme diabody d'un anticorps spécifique (C6.5) du domaine extracellulaire de la molécule HER2/neu. L'essai a été réalisé chez la souris *nude* préalablement greffée par la lignée MDA-MB-361/DYT2 de carcinome mammaire humain au niveau de l'abdomen par une injection sous-cutanée. Une réponse anti-tumorale significative par rapport au groupe témoin non traité a été obtenue. Une seule dose de 0,74 MBq (20 μCi) permet de retarder la croissance tumorale de 10 jours, qui est la durée nécessaire pour que le volume des tumeurs du groupe témoin, double leur volume tumoral initial. Bien que la dose de 45 μCi soit proche de la dose maximale tolérée (DMT), elle permet d'obtenir 60% de rémission complète pour un suivi réalisé sur un an (Robinson, Shaller et al. 2008). Une seconde étude a été réalisée dans le cadre du traitement du cancer de l'ovaire radiorésistant et HER-2 positif. L'essai a été conduit chez la souris *nude* préalablement greffée par la lignée SKOV-3 de carcinome ovarien humain. L'équipe de Palm avait pour objectif d'évaluer la pertinence d'associer le trastuzumab (anticorps monoclonal spécifique de la molécule HER-2) avec le radioimmunoconjugué formé à partir du trastuzumab et de l' ^{211}At . L'administration intrapéritonéale de 500 μg de trastuzumab et d'une activité égale à 400 kBq de radiopharmaceutique est la plus pertinente. En effet, cette association permet d'obtenir une régression totale des tumeurs (Palm, Back et al. 2007).

• Les données cliniques

L'équipe de Zalutsky a démontré la faisabilité d'une administration intra-cavitaire chez des patients atteints de tumeurs cérébrales malignes comme le glioblastome. Il s'agit du premier essai publié dans ce domaine (Zalutsky, Reardon et al. 2008). 18 patients ont été traités à l'aide d'un anticorps chimérique spécifique de la ténascine (ch81C6) et couplé à

l' ^{211}At . L'administration du radiopharmaceutique a été réalisée au sein d'une résection tumorale. Plusieurs activités ont été testées: 74 MBq (2 mCi), 148 MBq (4 mCi), 248 MBq (6,7 mCi) et 370 MBq (10 mCi). Une médiane de survie de 15 mois a été observée pour l'ensemble des patients traités. Cette étude démontre une efficacité supérieure pour les patients atteints d'un glioblastome, par rapport aux études publiées précédemment. En effet, La médiane de survie obtenue pour 2 patients parmi les 14 atteints d'un glioblastome est de 37,5 mois. Cette valeur est plus élevée que les études précédentes publiées dans ce domaine, pour lesquelles on observe une médiane de 25 à 30 semaines (Nieder, Adam et al. 2006)

Le terbium 149, le plomb 212 et le radium 223 possèdent également des propriétés intéressantes pour la RIT α (tableau 3). Avec une demi-vie de 4 heures et possédant un fort transfert d'énergie linéique (TEL) de 142 keV/ μm , le ^{149}Tb porte de nombreux espoirs, malgré la difficulté de son approvisionnement (Allen and Blagojevic 1996). Le plomb 212, émetteur de rayonnements β , est utilisé *in situ* comme générateur de ^{212}Bi (Horak, Hartmann et al. 1997). L'utilisation thérapeutique du radium 223 reste limitée par l'émission du radon 219, premier élément de filiation du radium 223, pouvant être toxique pour les tissus sains. Une technique récente permet de limiter ce phénomène en introduisant le radium 223 ou 224 dans un liposome auquel est fixé un vecteur spécifique (Henriksen, Schoultz et al. 2004). Il possède également un tropisme pour le squelette pouvant être exploité pour le traitement des cellules cancéreuses situées à la surface des cellules osseuses (métastases osseuses dans le cancer de la prostate ou du sein) (Larsen 2003).

Radionucléide	$t_{1/2}$ (h)	Rayonnement imagerie	Rayonnement RIT	Distance parcourue (mm)	E_α (keV)	E_β (keV)
^{212}Bi	1,01	γ	α β - EC	0,04-0,1 2,68 <0,02	6090 6051	717,3
^{213}Bi	0,76	γ	α β - EC	0,04-0,1 1,32 <0,02	5870 5549 8400	430
^{225}Ac	240	γ	α EC	0,04-0,1 <0,02	5829 5792	
^{211}At	7,21	γ	α EC	0,04-0,1 <0,02	5867	
^{149}Tb	4,12	γ	α β + EC	0,04-0,1 3,71 <0,02	3967	921

Tableau 3. Principaux isotopes émetteurs alpha et caractéristiques de désintégration
(D'après Boswell et al. 2007)

DOTA : acide 1,4,7,10-tetra-azacyclododecane-tetra-acétique ; **CHX-A''-DTPA** : N-[2-amino-3-(p-isothiocyanato-phenyl)propyl]-trans-cyclohexane-1,2-diamine-N,N',N'',N''',N''''-penta-acetic acid ; **HEHA**: 1,4,7,10,13,16- hexaazacyclohexadecane-N,N',N'',N''',N'''',N'''''-hexa-acétique

VII. Les différentes formes et caractéristiques des vecteurs utilisés en RIT

Les anticorps radiomarqués sont des réactifs cliniques importants, d'un point de vue diagnostique en imagerie médicale et thérapeutique dans le cadre de la RIT. L'efficacité de la radioimmunothérapie provient principalement, de la toxicité du radioélément mais aussi de la qualité de la vectorisation de ce radioélément sur le site tumoral. Les propriétés du vecteur conditionnent donc le potentiel toxique du radioconjugué : la structure, l'affinité et la spécificité de l'anticorps pour l'antigène sont donc des caractéristiques déterminantes pour sa pharmacocinétique et sa biodistribution dans l'organisme et donc pour l'atteinte des cellules cibles.

1. Les différents vecteurs

a. Les immunoglobulines

Les anticorps sont des immunoglobulines, de forme tétramérique, elles associent 2 chaînes lourdes H et 2 chaînes légères L. Les premières analyses structurales ont montré que des traitements enzymatiques de ces glycoprotéines permettaient de distinguer une partie NH₂ terminale porteuse de la variabilité et de la liaison avec l'antigène et une partie constante caractéristique de l'isotype. Ainsi la papaïne génère des fragments Fab monovalents (Fab fragment antigen binding) et un fragment Fc constant (Fc fragment cristallisable) tandis que la pepsine, qui maintient intact les ponts disulfures entre les 2 chaînes lourdes, produit des fragments divalents liant l'antigène, F(ab')₂ et un fragment constant dégradé. Il existe différentes classes d'immunoglobulines (Ig), mais la classe des IgG est majoritairement utilisée en RIT. Les IgG sont des molécules multifonctionnelles, les régions variables fixent l'antigène et déterminent la spécificité de l'anticorps. Le fragment Fc possède des propriétés importantes comme la fixation du complément et la liaison aux cellules effectrices (monocytes, macrophages, lymphocytes, granulocytes et cellules NK) par l'intermédiaire de leurs récepteurs FcR. Le domaine Fc est également responsable d'un allongement de la demi-vie des IgG, par le biais d'une interaction avec le récepteur FcR néonatal (FcRn) (Woof and Burton 2004).

Très peu de données sont disponibles sur les voies d'élimination des anticorps monoclonaux. Les monographies des spécialités commercialisées ne mentionnent aucune

donnée hormis la valeur de la demi-vie terminale. Les IgG endogènes sont les protéines plasmatiques qui présentent la demi-vie d'élimination la plus longue, environ trois semaines. Cette longue demi-vie est liée à un récepteur saturable appelé FcRn situé dans les cellules endothéliales, les cellules intestinales et rénales. Le récepteur FcRn a été identifié dans les années 1970 mais son existence avait été suspectée une dizaine d'années auparavant. Ce récepteur est également présent dans les cellules placentaires. Il possède deux propriétés : le passage transcellulaire et le recyclage cellulaire. Il est impliqué dans le passage transplacentaire des IgG de la mère à l'enfant d'où son appellation, *n* pour néonatal (Israel, Taylor et al. 1997; Kobayashi, Suzuki et al. 2002). Ce récepteur participe également au recyclage des IgG. D'après le modèle proposé par Junghans et Anderson, les IgG sont captées à l'intérieur des cellules par pinocytose. Elles se lient aux récepteurs FcRn en milieu acide par l'intermédiaire de leur fragment Fc puis sont transférées à la surface cellulaire, pour être à nouveau disponibles. Les IgG non liées aux récepteurs FcRn, dans les vésicules de pinocytose (IgG en excès), sont transférées vers des lysosomes pour être dégradées (Junghans and Anderson 1996).

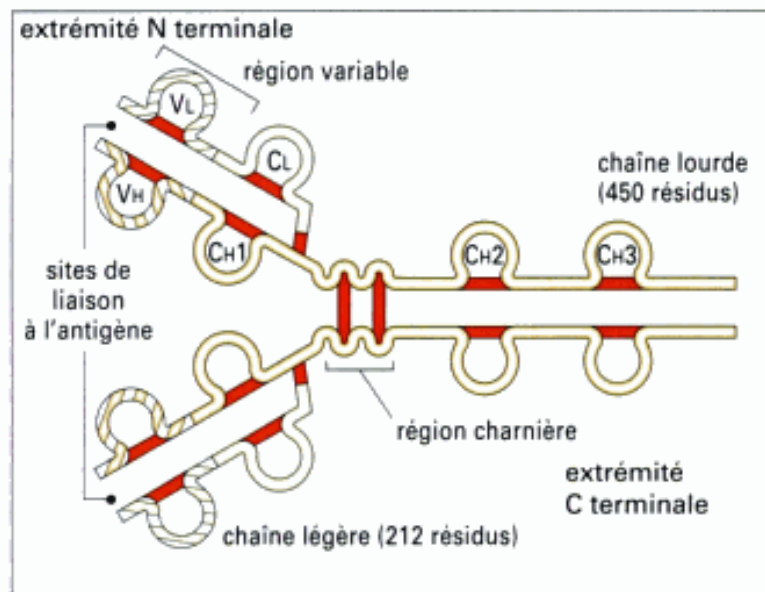


Figure 7. Structure de base d'une IgG1

(D'après Immunologie, par David Male, Yvan Roitt, Johnatan Brostoff, David B Roth - Publié par Elsevier Masson, 2007)

Les régions N terminales des chaînes lourdes (H) et légères (L) de l'IgG1 sont caractérisées par des séquences variables (V) appelées respectivement régions V_H et V_L . Le reste de la molécule a une structure relativement constante (C). La partie constante de la chaîne légère est appelée région C_L . La partie constante de la chaîne lourde comprend trois régions différentes : C_{H1} , C_{H2} , et C_{H3} . Ces régions globulaires stabilisées par des ponts disulfures intracaténaires, sont appelées "domaines". Les deux sites de liaison à l'antigène sont localisés dans les régions variables. La région charnière est un segment de chaîne lourde situé entre C_{H1} et C_{H2} . La flexibilité de cette zone permet aux deux sites de liaison à l'antigène d'agir indépendamment. Il y a un appariement étroit des domaines à l'exception de la région C_{H2} .

En comparaison avec la petite taille des agents de chimiothérapie (moins de 1 kDa), les anticorps sont des protéines volumineuses d'environ 150 kDa. Si ces protéines présentent une bonne stabilité en milieu sérique, elles présentent des cinétiques de distribution plus lentes et possèdent une capacité de pénétration dans les tissus, limitée par rapport aux petites molécules. Une répartition non homogène de l'anticorps peut être ainsi observée au niveau des tumeurs solides après injection intraveineuse (Yokota, Milenic et al. 1992).

b. Les fragments d'anticorps

La taille du vecteur conditionne ainsi la biodistribution du radioconjugué. Elle va en effet influencer sa clairance et le temps requis pour atteindre le site tumoral. Ce constat a conduit au développement de vecteurs dérivés des anticorps entiers de plus petites tailles. La structure en domaines a favorisé cet essor. L'idée était d'obtenir la plus petite molécule capable de se lier à l'antigène. Les premiers fragments d'anticorps, obtenus par digestion enzymatique, sont les fragments $F(ab')_2$ bivalents (1×10^5 daltons) et Fab monovalents (5×10^4 daltons). L'ingénierie génétique a permis ensuite de se limiter aux seuls domaines variables (VH et VL) pour produire des fragments variables, (Fv), dont la forme à chaîne unique, est obtenue grâce à un peptide de jonction entre VH et VL (Huston, Levinson et al. 1988). Ces molécules ont également une demi-vie biologique relativement courte et une excrétion rénale plus rapide. Ces fragments atteignent des sites tumoraux non accessibles aux IgG entières et se répartissent de façon homogène. Le groupe de Yokota a étudié la relation entre la taille de différents fragments et sa fixation à la tumeur (Milenic, Yokota et al. 1991; Yokota, Milenic et al. 1992). Cette étude a montré une fixation (% de la dose injectée/g) maximale à la tumeur, différente pour chaque type de fragment, IgG entière, $F(ab')_2$, Fab' et ScFv, soit respectivement, 10,2% à 48h, 20,8% à 6h, 6,2% à 6h et 2,6% à 6h. Les plus fortes doses sont obtenues en 6h pour le fragment ScFv (2,6%), et seulement à 48h pour l'IgG entière (10,2%). Ces données montrent que la petite taille des fragments ScFv leur permet d'atteindre le tissu tumoral plus rapidement, mais nécessite des injections de doses plus importantes pour atteindre une dose fixée à la tumeur équivalente à celle obtenue après administration d'une IgG entière.

Il est également possible d'obtenir à partir des ScFv, des formats variés appelés minibody, bi-ScFv, diabody, tribody, tetrabody, qui peuvent conduire à des fragments d'anticorps bispécifique, voire trispécifique (Holliger and Hudson 2005). L'intérêt est de produire des formes multimériques qui augmentent leur affinité et la rétention du radioimmunconjugué, ce qui permet d'optimiser la dose fixée à la tumeur.

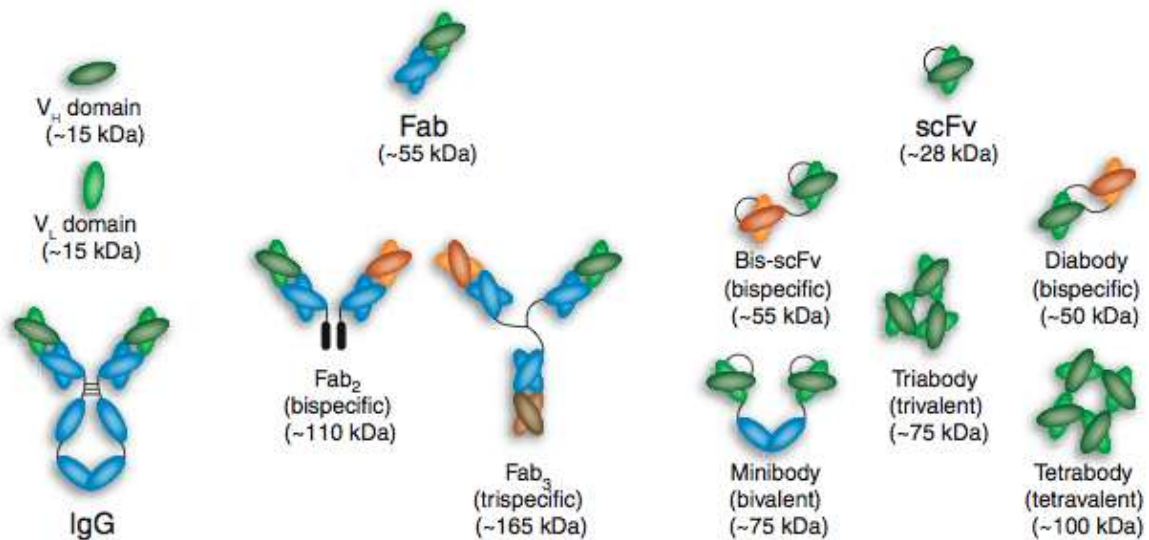


Figure 8. Représentation schématique des différents formats d'anticorps
(D'après Holliger P. et Hudson P, Nature Biotechnology 23 (2005) 1126-1136)

La comparaison de la pharmacocinétique et de la biodistribution des différents fragments d'anticorps a fait l'objet de nombreuses études pré-cliniques (Colcher, Pavlinkova et al. 1998). Dans la majorité des modèles étudiés, la fixation tumorale et le temps de rétention d'une IgG entière sont supérieurs par rapport à ceux d'une IgG fragmentée. Cependant la distribution des IgG entières reste moins homogène que celles des fragments d'anticorps et présente une clairance sanguine plus lente. Un compromis doit être trouvé entre la taille du vecteur permettant d'assurer sa stabilité *in vivo* et celle qui permet l'élimination rapide de la circulation sanguine du vecteur non fixé à la surface des cellules tumorales.

La structure et la taille du vecteur conditionnent donc son parcours jusqu'à la cible antigénique, mais aussi son devenir dans l'organisme. L'affinité et la spécificité du vecteur sont des paramètres également important à considérer pour pouvoir garantir le succès d'un protocole de RIT.

2. Les caractéristiques du vecteur

a. La spécificité du vecteur

Les différents vecteurs utilisés aujourd'hui dans les protocoles cliniques sont très rarement dirigés contre un antigène réellement spécifique des cellules tumorales. L'efficacité du ciblage va dépendre du différentiel d'expression de l'antigène ciblé, entre les cellules cancéreuses et les cellules saines. Ce taux d'expression est lié aux caractéristiques des cellules tumorales mais également à leur structure. En effet, la formation d'amas cellulaires entraîne la présentation à leur surface d'un grand nombre d'antigènes. Les antigènes ciblés en RIT dans le traitement des LNH, incluent des antigènes de différenciation comme le CD20. Cet antigène est une protéine membranaire exprimée à la surface des cellules B matures, et est exprimé par plus de 95% des cellules B des patients atteints de lymphomes (Stashenko, Nadler et al. 1980). Cette molécule est absente des cellules souches, des cellules présentatrices de l'antigène et des tissus non lymphoïdes. Dans ce cas, l'utilisation d'anticorps, comme le rituximab, reconnaissant le CD20, couplé à un radioélément β , entraîne la destruction des cellules saines exprimant l'antigène, mais n'induit pas d'effets secondaires majeurs. Ces cellules sont en effet renouvelables, et comme les cellules souches hématopoïétiques ne sont pas atteintes, on observe une myélosuppression transitoire avec une reconstruction rapide après l'arrêt du traitement.

b. L'affinité du vecteur

La spécificité de l'anticorps assure la localisation du radioconjugué à la tumeur, mais son affinité va définir la cinétique de fixation des anticorps au site tumoral (Schlom, Eggenberger et al. 1992). Cela va donc déterminer le temps de rétention du radioconjugué au niveau des cellules tumorales ainsi que les quantités d'anticorps nécessaires pour une fixation optimale sur la tumeur. L'anticorps radiomarqué doit pouvoir effectuer son effet toxique sur les cellules tumorales, mais il doit également être dégradé et éliminé le plus rapidement possible de la circulation sanguine afin de limiter une accumulation au niveau des tissus sains. L'un des objectifs de l'immunociblage des tumeurs est de trouver des anticorps présentant une affinité élevée pour leur antigène afin de potentialiser la fixation spécifique.

L'augmentation de l'affinité d'un anticorps radiomarqué permet d'injecter des concentrations plus faibles d'anticorps pour fixer un même nombre d'antigènes. Il en est de même pour les fragments d'anticorps. Des études ont été menées afin d'augmenter l'affinité des fragments ScFv, dans le but d'augmenter la fixation tumorale.

La mise en place d'un essai de RIT nécessite d'utiliser un anticorps qui soit très affiné et spécifique pour sa cible antigénique. Une constante de dissociation de l'ordre du nM est souhaitable pour qu'un anticorps soit efficace en RIT. Il est également important de considérer certains aspects limitant l'efficacité de cette approche pour pouvoir ensuite optimiser les différents protocoles.

c. L'immunogénicité du vecteur

Les premiers anticorps monoclonaux développés étaient entièrement murins, ce qui limite leur utilisation chez l'homme. En effet, l'injection d'une IgG entière peut entraîner une réponse du patient contre cette protéine étrangère. Cette réponse connue sous le nom de *HAMA*, pour *Human Anti-Mouse Antibody*, limite le nombre d'injections que l'on peut réaliser chez un même patient (Khazaeli, Conry et al. 1994; Hwang and Foote 2005). Ce type de réponse entraîne une élimination rapide des anticorps murins et des effets adverses parfois sévères. Le développement de cette réponse peut être variable d'un anticorps à l'autre. Ils peuvent diminuer l'efficacité thérapeutique en modifiant les paramètres de biodistribution ainsi que la pharmacocinétique de l'anticorps (DeNardo, Bradt et al. 2003). Dans la pratique de RIT, l'immunogénicité du vecteur peut poser un problème pour les protocoles d'injections fractionnées. Les limites des anticorps murins ont ainsi motivé les équipes de recherche à les rendre plus utilisables chez l'homme. Les techniques de chimérisation et d'humanisation des anticorps ont permis de diminuer cette réaction. En effet, le développement de l'ingénierie génétique des anticorps a permis de transformer progressivement les anticorps murins en anticorps humanisés voir totalement humains. Cette transformation a d'abord conduit à la construction d'anticorps chimériques, dans lesquels les régions constantes des chaînes lourdes et légères, des IgG murines sont remplacées par des régions constantes humaines (Morrison, Johnson et al. 1984). Cette chimérisation conduit à une diminution importante des réponses immunes dirigées contre les régions murines. Une autre conséquence de la substitution d'un fragment Fc murin par un fragment humain est une cytotoxicité accrue due à une interaction de meilleure affinité avec le récepteur FcγR présent sur les cellules effectrices des patients.

Cependant, la formation d'anticorps dirigés contre les anticorps chimériques (HACA, pour *Human Antibody Chimeric Antibody*) est retrouvée chez 40% des patients (Hwang and Foote 2005). Une humanisation des anticorps a été décrite pour la première fois par l'équipe de Greg Winter en 1986 (Jones, Dear et al. 1986). Initialement, elle consiste à remplacer les régions hypervariables (CDR pour *Complementary Determining Region*) d'un anticorps humain par des régions CDR d'origine murine : l'anticorps ainsi construit est dit humanisé, puisque moins de 10% de ses séquences peptidiques sont d'origine murine.

Une approche permet aujourd'hui d'obtenir des anticorps totalement humains à partir de banques combinatoires construites avec des domaines VH et VL humains en utilisant des techniques de sélection *in vitro* comme le *phage display*. Cette technique permet de diminuer la production des anticorps humains dirigés contre les anticorps humanisés (HAHA pour *Human anti-human Antibody*). Après une sélection par *phage display*, les domaines VH-VL spécifiques de l'antigène d'intérêt, sont fusionnés aux régions constantes d'IgG humaine pour générer des anticorps complets. Enfin, une autre méthode permet de générer des anticorps monoclonaux humains. Elle est fondée sur l'utilisation de souris transgéniques comportant dans leur génome une grande partie des gènes codant pour les immunoglobulines humaines (Lonberg 2005). Dans la pratique de RIT, l'immunogénicité du vecteur pose un problème potentiel pour les protocoles d'injections fractionnées.

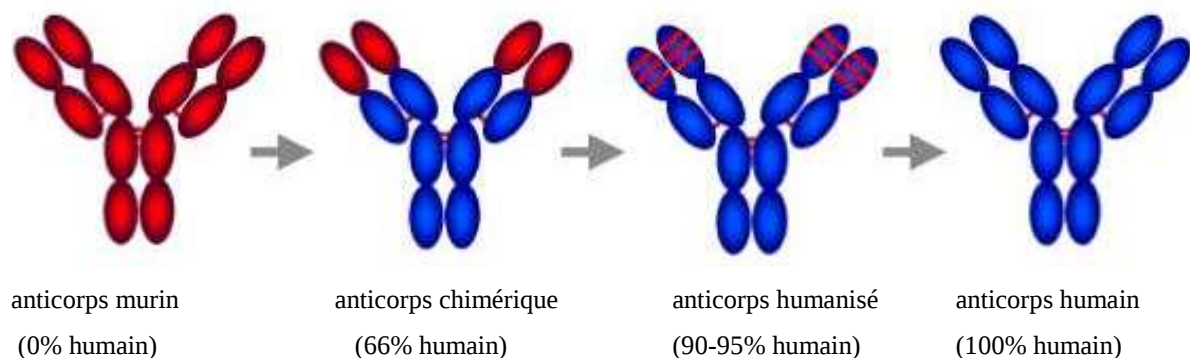


Figure 9. Représentation schématique du développement des anticorps thérapeutiques
(D'après Goldenberg et al. 2002)

VIII. Facteurs limitant l'efficacité de la RIT

Outre le problème d'immunogénicité des anticorps, que nous avons évoqué précédemment, il existe d'autres facteurs susceptibles de diminuer l'efficacité des protocoles de RIT, compte tenu de la diversité des radioisotopes disponibles en cliniques et de leurs propriétés physiques intrinsèques. Ces facteurs peuvent également dépendre de la tumeur et de son micro-environnement.

1. La toxicité aux tissus sains

L'irradiation non spécifique est un facteur limitant les protocoles de RIT. L'anticorps ainsi que ses propres métabolites peuvent rester pendant plusieurs jours, voire plusieurs semaines, dans l'organisme sous forme libre. Les organes non ciblés sont alors directement exposés à une irradiation potentielle, en particulier la moelle osseuse, le foie et les reins. La moelle osseuse est le principal facteur limitant les protocoles de RIT. Une greffe de cellules souches hématopoïétiques peut être parfois envisagée.

L'ensemble des radionucléides actuellement utilisés dans les protocoles cliniques, possèdent un tropisme particulier pour un site biologique, expliquant la forte toxicité sur certains organes : l' ^{131}I et l' ^{211}At pour la thyroïde, l'intestin et les poumons ; le ^{212}Pb pour les cellules de la lignée érythrocytaire et le squelette ; le $^{212/213}\text{Bi}$ pour les reins ; l' ^{225}Ac pour l'os et le foie ; et l' ^{90}Y pour l'os (Zalutsky and Vaidyanathan 2000; Hassfjell and Brechbiel 2001; McDevitt, Ma et al. 2001). L'un des aspects fondamental de la RIT est donc la recherche de la stabilité du radioimmunoconjugué *in vivo* (Milenic, Brady et al. 2004).

2. La stabilité du radioimmunoconjugué *in vivo*

La stabilité *in vivo* du radioimmunoconjugué est un paramètre important qui permet d'optimiser l'irradiation des cellules tumorales ciblées tout en minimisant la toxicité aux tissus sains, associée à la dégradation des radiopharmaceutiques. Le radioimmunoconjugué est susceptible également d'être catabolisé après internalisation du complexe formé avec l'antigène ou simplement suite à la décroissance du radionucléide. Plusieurs techniques ont été testées et validées pour la conjugaison d'un radioisotope à un vecteur. Ces méthodes ont

été établies en fonction de la nature du radionucléide. Suivant la nature chimique (métal ou halogène) du radionucléide à coupler au vecteur, on distingue différentes voies de marquage selon que l'isotope radioactif est couplé directement à l'anticorps (voie directe) ou via un synthon organique (voie indirecte).

a. Couplage des isotopes halogénés

• L'iode 131 (^{131}I)

Le marquage de l'anticorps avec ce radioélément est réalisé directement, par fixation covalente de l'iode aux résidus tyrosines, par la technique dite à l'"Iodo-Gen" (1,2,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril), qui présente l'avantage d'être facilement mise en œuvre en système clos (Karonen 1990). Après oxydation sous une forme I^+ , l'iode est susceptible de réagir directement à pH=7 par une substitution électrophile sur les noyaux tyrosyle ou histidyle présents au niveau de certains acides aminés des chaînes polypeptidiques (Comet and Vidal 1998). Lorsque les anticorps sont sensibles à des conditions oxydantes, que les noyaux tyrosyles ou histidyles sont inaccessibles, ou que le marquage direct s'avère instable *in vivo* la radioiodination par voie directe n'est plus réalisable. Afin de résoudre ce problème, il est possible d'utiliser des synthons organiques (groupements prosthétiques) qui possèdent, dans le cas du marquage à l'iode, un site d'iodation et un site d'ancrage au vecteur. Les principales fonctions utilisées pour ce couplage sont de type isothiocyanate ou N-hydroxysuccinimidyl qui réagiront sur les groupement amine (NH_2) ou thiol (SH) présents au niveau des lysine et cystéine de la protéine. L'iodation par voie indirecte est réalisée en 2 temps. Dans un premier temps, l'iode est fixé au synthon puis l'ensemble est couplé au vecteur. Parmi les groupements les plus utilisés pour l'iode, on peut citer : le réactif de Bolton-Hunter, les sels de diazonium et les organostanniques.

Un phénomène de déshalogénéation de l'anticorps, augmentant avec le nombre d'atomes d' ^{131}I fixés par anticorps, est parfois observé. Il peut être ainsi, la cause d'une fixation tumorale insuffisante. La fixation extra-tumorale peut également expliquer cette insuffisance. En effet, la découverte d'un transporteur spécifique de l'iode, le symporteur Na^+/I^- (NIS) a permis de comprendre le métabolisme de l'iode (Dai, Levy et al. 1996). En dehors de la thyroïde, ce symporteur a été retrouvé dans plusieurs tissus de l'organisme à des niveaux différents d'expression. Il a été mis en évidence sur les membranes baso-latérales des cellules épithéliales ductales des glandes salivaires et des cellules épithéliales sécrétrices du

mucus de l'estomac. Il est également exprimé au niveau des glandes mammaires (Tazebay, Wapnir et al. 2000; Upadhyay, Singh et al. 2003). Le NIS constitue aujourd'hui une cible potentielle pour le traitement des cancers du sein et du foie (Dadachova, Nguyen et al. 2005; Hwang do, Kang et al. 2007). Il est également exploité en thérapie génique dans le traitement du cancer de la thyroïde (Smit, Shroder-van der Elst et al. 2000), et du sein (Nakamoto, Saga et al. 2000).

- **L'astate 211 (^{211}At)**

L'équipe de Zalutsky a développé une technique de marquage de l'astate en deux temps aussi bien avec des anticorps entiers que sur des fragments en utilisant un groupement prosthétique, le N-succinimidyl-3(triméthylstannyl)-benzoate (SAB). Le couplage prend environ 1,5 h, ce qui reste compatible avec la demi-vie de l' ^{211}At (7,2 h), et permet d'obtenir des activités spécifiques de l'ordre de 148 MBq/mg (4 mCi/mg) (Zalutsky, Schuster et al. 1996). Cependant cette approche de radiomarquage reste à optimiser pour pouvoir assurer la stabilité du radioconjugué *in vivo*, en raison d'un phénomène de déastatination, ayant pour conséquence une accumulation du radionucléide au niveau de l'estomac, de la thyroïde et des poumons (Zalutsky and Pozzi 2004). Cette fixation non spécifique responsable d'une toxicité à plus ou moyen terme, est due au transport actif de l'astate par le symporteur sodium/iode (NIS), précédemment évoqué pour le marquage de l' ^{131}I (Spitzweg, Joba et al. 1998; Vayre, Sabourin et al. 1999; Tazebay, Wapnir et al. 2000; Spitzweg, Dutton et al. 2001; Petrich, Helmeke et al. 2002; Carlin, Akabani et al. 2003). Enfin il faut noter que l'embranchement conduisant au ^{211}Po peut conduire à une libération de l'isotope du radioimmunoconjugué avant l'émission alpha, dans 58% des cas. Une demi seconde (demi-vie du ^{211}Po) peut être suffisante pour venir irradier les tissus sains.

b. Couplage des isotopes métalliques

Afin de réaliser le marquage d'un anticorps avec un radionucléide métallique, on couple un groupe prosthétique chélatant au vecteur et on pratique le radiomarquage dans un second temps. Dans ce type de marquage, le groupement prosthétique est constitué d'un agent chélatant bifonctionnel activé permettant d'une part, sa conjugaison à la protéine et d'autre part, la complexation du radionucléide d'intérêt. Les agents les plus souvent rencontrés sont

des composés semi-rigides dérivés de l'acide diéthylène-triamino-penta-acétique (DTPA), ou des macrocycles polyaminocarboxyliques de type acide tétra-azacyclododécane-tétra-acétique (DOTA). Le choix du chélate va dépendre de la stabilité du complexe formé avec un radionucléide donné. Cette stabilité est évaluée à partir de la constante de complexation (K_c) et de la cinétique réactionnelle. Ces deux paramètres doivent être les plus élevés possibles pour garantir la stabilité d'un complexe. La vitesse d'échange sera par conséquent la plus faible possible, pour pouvoir éviter le relargage de l'isotope dans le milieu environnant, pouvant être à l'origine du phénomène de transchélation *in vivo* (Liu 2008).

• Le bismuth 213 (^{213}Bi)

Le premier agent chélatant fonctionnel utilisé pour coupler le ^{213}Bi à un anticorps, est l'acide trans-cyclohexyldiéthylène triamine pentaacétique (CHX-A''-DTPA) (Brechtel 1992). La procédure de marquage du ^{213}Bi demande environ 30 minutes, correspondant à un délai compatible avec sa demi-vie, de 45,6 minutes. L'anticorps monoclonal murin M195 et sa forme humanisée HuM195 spécifique de l'antigène CD33, ainsi que l'anticorps J591 spécifique de l'antigène spécifique de la membrane prostatique ont été conjugué au ^{213}Bi par l'intermédiaire du CHX-A''-DTPA (Jurcic, Caron et al. 1995). La conjugaison de l'anticorps HuM195 avec cet agent bifonctionnel a rendu possible la fixation de plusieurs agents chélatant (plus de 10) par molécule d'anticorps. Les différents essais menés avec ce chélate ont montré un rendement de marquage de l'ordre de 90% après 10 à 20 minutes de complexation. L'équipe de Vandenbulcke a réalisé également avec succès le marquage du rituximab (anti-CD20) au ^{213}Bi , en utilisant la molécule CHX-A''-DTPA (Vandenbulcke, De Vos et al. 2003). Plusieurs ligands dérivés de l'acide penta-acétique diéthylène triamine (DTPA) ont été synthétisés, comme le p-isothiocyanatobenzyl-DTPA (CITC-DTPA) pour le radiomarquage des anticorps B-B4, spécifique du syndecan-1 et MA5 spécifique de la molécule MUC-1 (Mishra, Iznaga-Escobar et al. 2002). Durant ce travail de thèse, nous avons choisi le CHX-A''-DTPA pour pouvoir coupler le ^{213}Bi à l'anticorps B-B4. La structure semi-rigide du CHX-A''-DTPA permet de pré-agencer dans l'espace les liaisons possibles avec le radionucléide (avantage par rapport au DTPA, dont les groupements ne sont pas préalablement agencés dans l'espace). Les conditions de marquage sont également moins drastiques que celles imposées pour la complexation du DOTA.

- **L'actinium 225 (^{225}Ac)**

Deux agents chélatant macrocycliques sont actuellement utilisés pour le radiomarquage des anticorps avec l' ^{225}Ac , l'acide 1,4,7,10-tétra-azacyclododecane-tétra-acétique (DOTA) et l'acide 1,4,7,10,13,16-hexaazacyclohexadécane-hexaacétique (HEHA). Il a été démontré une plus grande stabilité des radioimmunoconjugués formés avec le DOTA. En effet, les produits formés avec l'HEHA ne sont pas internalisés et peuvent libérer dans le milieu extra-cellulaire les éléments de filiation contribuant à la radiotoxicité du radioimmunoconjugué. La molécule HEHA possédant 6 fonctions carboxyliques, ce défaut d'internalisation peut être due à la charge nette négative des complexes formés, limitant le passage transmembranaire (Chappell, Deal et al. 2000 ; Kennel, Chappell et al. 2000). Par ailleurs, l' ^{225}Ac sous forme libre peut également se fixer au niveau du foie et du squelette. Les complexes formés avec le DOTA sont beaucoup plus stables *in vivo* et les anticorps sélectionnés pour ces études forment des complexes immuns internalisés (Miederer, Henriksen et al. 2008).

3. Le micro-environnement tumoral

a. L'hétérogénéité vasculaire

L'ingénierie des anticorps n'est pas suffisante pour optimiser les protocoles de RIT. En effet, la taille et la structure des anticorps n'est pas le seul facteur limitant l'efficacité de la RIT. Après une injection par voie parentérale, le radioimmunoconjugué doit traverser l'endothélium vasculaire pour ensuite diffuser dans le stroma tumoral pour enfin atteindre sa cible tumorale. Des études récentes ont permis de comprendre et déterminer les barrières physiques et physiologiques jouant un rôle central dans le transport et la fixation à la tumeur du radioimmunoconjugué. Il est donc possible aujourd'hui de moduler certains paramètres comme le flux sanguin tumoral, la perméabilité vasculaire, et la pression interstitielle fluïdique (IFP pour *Interstitial Fluid Pressure*), afin d'optimiser la perfusion du radioimmunoconjugué au sein de l'environnement tumoral.

Le transport intravasculaire des molécules s'effectue par diffusion et convection. Le phénomène de diffusion est proportionnel au gradient de concentration observé entre le plasma et le fluide interstitiel. Le phénomène de convection dépend des mouvements du

fluide interstitiel et est proportionnel au gradient de pression. Les macromolécules (PM >5kDa), comme les anticorps, migrent principalement par convection, le passage de ces molécules, de la circulation sanguine vers la matrice interstitielle tumorale est lente. A l'inverse, les petites molécules (PM < 2kDa) vont migrer principalement par diffusion et atteindre la matrice tumorale plus rapidement que les macromolécules. La surface vasculaire moyenne diminue lorsque la taille de la tumeur augmente. Par conséquent, la perfusion tissulaire et le ciblage tumoral seront plus importants au niveau des petites masses tumorales (Behr, Memtsoudis et al. 1999 ; Behr, Liersch et al. 2002)). Le transport des molécules au niveau de l'interstitium s'effectue également par convection ou diffusion. Néanmoins, au niveau du tissu tumoral, dépourvu de réseau capillaire lymphatique, la migration des molécules s'effectue principalement par diffusion (Jain 1987). La structure et la fonction des vaisseaux tumoraux sont différentes de ceux des tissus normaux. Leur distribution hétérogène et leur structure tortueuse (Dvorak 2003; Jain 2005) conduisent à une élévation de la pression interstitielle, responsable de la faible diffusion des macromolécules au sein du micro-environnement tumoral (Jain 1987; Jain and Baxter 1988). Cette architecture permet d'expliquer la fixation de structures, telles que les liposomes ou les colloïdes, et certains anticorps n'ayant aucune spécificité pour un type de tumeur donné.

b. L'hypoxie tumorale

Depuis de nombreuses années, l'hypoxie tumorale est reconnue comme un facteur limitant la réponse au traitement. L'hypoxie tissulaire est une caractéristique physiopathologique quasiment constante au sein des tumeurs solides chez l'homme (Raleigh, Dewhirst et al. 1996; Harrison and Blackwell 2004; Marchal, Rangeard et al. 2005). Les régions hypoxiques sont définies comme des volumes tissulaires où la pression partielle en oxygène (PO₂) est inférieure ou égale à 10 mmHg. Cette hypoxie est identifiée dans les cancers du sein (Vaupel, Briest et al. 2002) et du col de l'utérus (Vaupel, Thews et al. 2001) ainsi que dans les cancers de la sphère ORL (Lartigau, Le Ridant et al. 1993; Nordmark, Bentzen et al. 2005), du rectum (Mattern, Kallinowski et al. 1996), de la prostate (Movsas, Chapman et al. 2000), les tumeurs cérébrales (Cruickshank, Rampling et al. 1994), les sarcomes (Brizel, Scully et al. 1996) et les mélanomes (Lartigau, Randrianarivelo et al. 1997).

Depuis les années 1950, les travaux de Thomlinson et Gray (Thomlinson and Gray 1955) puis de Tannock (1968) (Tannock 1968) ont démontré l'organisation tumorale en

"corde", correspondant à une nécrose hyaline à une distance de 100 à 180 μm des capillaires, entourée de tissus viables. Cette architecture était pour le groupe de Gray (Gray, Conger et al. 1953) en rapport avec une possible diminution de la radiosensibilité. A côté de cette hypoxie chronique ou permanente, une hypoxie aiguë ou transitoire a été décrite plus récemment. Liée à des occlusions transitoires des vaisseaux tumoraux dans des régions tumorales, elle résulte en grande partie de l'élévation intra-tumorale des pressions interstitielles.

L'hypoxie est un facteur majeur de radiorésistance (Belkacémi, Tsoutsou et al. 2006). Pour les cellules soumises à des radiations ionisantes, les cassures doubles brins de l'hélice d'ADN constituent un événement létal important. Ces cassures sont l'effet direct des radiations déposant l'énergie sur les brins d'ADN, ainsi que de l'effet indirect par l'intermédiaire des radicaux libres issus de la radiolyse de l'eau avec les rayonnements de faible TEL. Plus l'oxygène est présent dans la cellule au moment de l'irradiation, plus il va intervenir au sein de la cascade radicalaire en amplifiant l'effet cytotoxique (Hall 1994) (par cassures double-brin de l'ADN). La présence d'oxygène stabilise les radicaux libres causant les dommages de l'ADN et diminue la capacité de la cellule tumorale à les réparer (Kumar 2000).

En cours de radiothérapie fractionnée, la situation devient plus complexe, puisque le phénomène de réoxygénation se déroule entre les fractions. Bien que les cellules hypoxiques puissent réacquérir une certaine radiosensibilité, cette réoxygénation est très variable et n'est pas toujours assez rapide (Vaupel 1997). Les radioéléments de TEL élevé ont en outre l'avantage d'avoir une efficacité biologique pratiquement indépendante de l'oxygénation du tissu tumoral, puisque les lésions de l'ADN sont essentiellement directes et passent très peu par la radiolyse de l'eau et les radicaux peroxydes (Hall 1994).

L'existence de ces différents facteurs limitants oblige les équipes de recherche à développer des nouvelles approches, assurant le succès de la RIT.

IX. L'optimisation des protocoles de RIT

Mise à part l'augmentation de l'affinité de l'anticorps et le choix judicieux du radionucléide associé, de nombreuses autres mesures ont été développées permettant d'augmenter l'efficacité de la RIT. Elles visent à augmenter le temps de résidence du radionucléide au niveau de la cible antigénique, ou augmenter leur cytotoxicité.

1. Augmenter le degré de fixation du radioimmunoconjugué

Les différentes méthodes d'administration du radioimmunoconjugué qui permettent d'augmenter la toxicité tumorale tout en diminuant la dose absorbée par les tissus sains, comme le fractionnement de la dose ou les techniques de ciblage en deux temps, ont été validées en cliniques.

a. Le fractionnement de la dose administrée

Cette technique permet de délivrer une activité en plusieurs fois afin de réduire la toxicité aux tissus sains et d'augmenter ainsi l'activité cumulée à la tumeur. Dans ce cadre, le modèle de carcinome colique LS-174T a fait l'objet de nombreuses études. L'équipe de Schlom a mis en évidence les avantages du fractionnement de la dose administrée d'un anticorps monoclonal (B72.3) spécifique de la molécule TAG72 et couplé à l' ^{131}I . Cette étude avait pour objectif de comparer l'injection d'une simple activité de 22,2 MBq (600 μCi), responsable de la mort de 60% des animaux, avec l'administration de deux activités de 11,1 MBq (300 μCi). Le fractionnement de l'activité a permis de diminuer et même d'éliminer la croissance tumorale chez 90% des animaux traités avec seulement 10% de mortalité (Schlom, Molinolo et al. 1990). En 1993, le groupe de Pedley a testé sur le même modèle (LS174-T) l'efficacité thérapeutique du fragment F(ab')_2 anti-CEA couplé à l' ^{131}I , dans un protocole de doses fractionnées. Cette étude montre que l'administration d'une activité de 37 MBq (1mCi) en 3 activités de 12,21 MBq (0,33 mCi) diminue de façon significative l'efficacité thérapeutique (Pedley, Boden et al. 1993). Ces résultats sont discutables, sachant que ce type d'approche dépend de nombreux facteurs, incluant le nombre d'injections réalisées, l'intervalle de temps entre chaque activité administrée, et le temps de dédoublement de la tumeur. La forme du vecteur n'est peut-être pas adaptée à ce type d'approche, la demi-vie biologique plus courte et l'excrétion rénale plus rapide d'un fragment F(ab')_2 peuvent limiter l'accumulation de la radioactivité au niveau du site tumoral.

L'administration d'une dose fractionnée des fragments tétravalents ($[\text{Sc(Fv)}_2]_2$) et divalents $[\text{Sc(Fv)}_2]$ de l'anticorps CC49 spécifique de la molécule TAG-72, a permis d'augmenter de façon significative la survie des souris traitées (Goel, Augustine et al. 2001). Cette modalité d'administration a été également testée en clinique dans des études de phase I/II. La première a été publiée par l'équipe de Linden en 2005. Les patients atteints d'un

lymphome B ont reçu l'anticorps epratuzumab (spécifique du CD22) couplé à l' ^{90}Y , à raison d'une dose de 185 MBq/m^2 (5 mCi/m^2), administrée une fois par semaine pendant 2 à 4 semaines. Cette dose a été suivie par l'administration de l'anticorps non radiomarqué. Le taux de réponses globales a été évalué à 62%, avec 25% de réponses complètes (Linden, Hindorf et al. 2005).

Le fractionnement de la dose permet de rendre plus homogène la distribution du radioimmunoconjugué au sein de la tumeur. Cette stratégie va permettre de diminuer la toxicité du traitement et d'augmenter la dose maximale tolérée. Elle prolonge la réponse tumorale en augmentant la durée du traitement. Ce mode d'administration a cependant été limité par l'immunogénicité des IgG totales d'origine murine, utilisées comme vecteurs. L'ingénierie des anticorps a permis de diminuer ce facteur limitant et rendre plus efficace cette stratégie. Les essais cliniques actuels tentent de déterminer l'intervalle de dose optimal, en utilisant un vecteur non immunogène visant à réduire la myélotoxicité tout en augmentant la fixation et la distribution au sein de la tumeur (pour revue DeNardo, Schlom et al. 2002).

b. Le pré-ciblage des tumeurs

Cette technique est aujourd'hui utilisée en clinique. Elle permet de concilier une captation tumorale élevée du radioimmunoconjugué et stable avec une élimination rapide de la radioactivité présente dans les tissus sains. Afin de modifier les propriétés pharmacocinétiques de l'agent radioactif, des procédés en deux temps ont été développés, dans lesquels la reconnaissance de l'antigène ciblé par l'anticorps est dissociée du ciblage de l'isotope. Ce concept repose sur l'administration de deux réactifs : dans un premier temps un anticorps dirigé contre l'antigène tumoral cible est injecté suivi, dans un second temps, de l'injection d'une molécule portant la radioactivité, et capable de se fixer à l'anticorps. Cette dernière molécule doit être de petite taille afin de se distribuer rapidement et de se lier à l'anticorps pré-ciblé. La petite taille de la molécule marquée lui permet également d'être éliminée rapidement de la circulation. Ces techniques permettent ainsi de diminuer la fixation non spécifique (Goldenberg, Sharkey et al. 2006). Différentes approches ont été développées dans cette perspective, tout d'abord l'utilisation d'un anticorps biotinylé non radiomarqué associé à de l'avidine ou à de la streptavidine radioactive, ou alors l'utilisation d'un anticorps couplé à de la streptavidine associé à de la biotine radiomarquée, ou enfin l'utilisation d'un anticorps bispécifique avec un bras dirigé contre un antigène tumoral et un bras dirigé contre

un haptène que l'on peut radiomarquer. Cependant, ces stratégies de ciblage restent délicates à mettre en oeuvre. Si le délai entre les deux injections est trop important ou si l'affinité de l'anticorps pour la petite molécule est trop faible, la plus grande partie de celle-ci est éliminée trop rapidement et l'efficacité du ciblage est faible. Au contraire, si cette affinité est trop élevée ou si l'on réduit le délai entre les deux injections, la petite molécule sera piégée par l'anticorps circulant en excès et suivra alors la clairance plasmatique lente de celui-ci sans amélioration du contraste (Rosebrough 1996).

La technique Affinity Enhancement System (AES) est la technique de préciblage ayant atteint le stade le plus avancé du développement clinique. Cette technique actuellement développée par la société IBC Pharmaceuticals (Morris Plain, New Jersey) associe un anticorps bispécifique (AcBs), anti-Ag tumoral/anti-haptène, et un haptène bivalent radiomarqué de PM inférieur à 1000 Da. La bivalence de l'haptène est déterminante, elle permet une liaison entre les AcBs pré-localisés à la surface des cellules tumorales et stabilise l'ensemble. Cette approche a été évaluée dans des études cliniques de phase I/II utilisant un AcBs anti-ACE x anti- DTPA-peptide et un haptène marqué à l'iode 131, avec des résultats thérapeutiques intéressants (Kraeber-Bodere, Bardet et al. 1999; Vuillez, Kraeber-Bodere et al. 1999; Kraeber-Bodere, Rousseau et al. 2006). 29 patients atteints de carcinome médullaire de la thyroïde ont été traités par cette approche (Chatal, Campion et al. 2006b). Une stabilisation de longue durée (plus de dix ans pour certains) de leur maladie a été observée dans 47% des cas. La survie de ces patients traités par RIT AES a été comparée à un groupe témoin de 39 patients non traités. Les patients à risque traités ont bénéficié d'une survie globale plus longue que les patients à risque non traités (médiane 110 vs 61 mois), les patients répondeurs ont bénéficié d'une survie globale plus longue que les non-répondeurs (médiane 159 vs 109 mois).

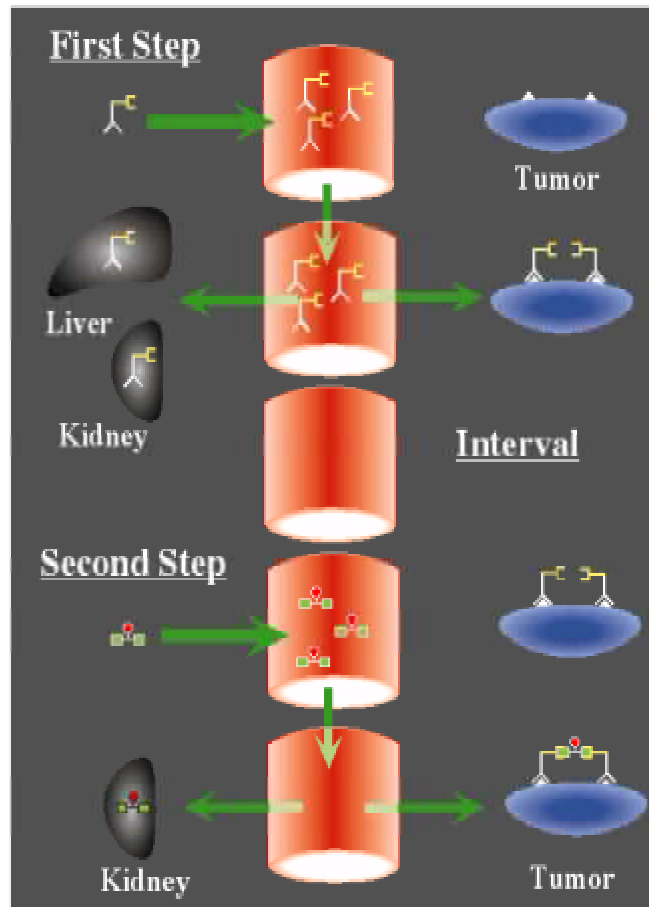


Figure 10. Représentation des différentes étapes de la technique de ciblage en deux temps des tumeurs par le système AES (Affinity Enhancement System). La première étape correspond à l'injection de l'anticorps bispécifique qui va se localiser au niveau de la tumeur. Après un intervalle de temps permettant l'élimination des anticorps non fixés à la tumeur, l'haptène radiomarqué est injecté.

c. Augmenter la perméabilité vasculaire et le flux sanguin intratumoral

La perturbation du flux sanguin et l'élévation de la pression interstitielle peuvent être responsables de la distribution hétérogène du radioimmunoconjugué au sein du tissu tumoral (Jain 1987). De plus, les régions hypoxiques résultant d'un faible apport sanguin contribuent à la radiorésistance de la tumeur. Ainsi, augmenter le flux sanguin et la perméabilité vasculaire, permet non seulement d'optimiser la distribution du radioimmunoconjugué, mais contribue également à rendre plus radiosensibles la tumeur.

- **L'angiotensine II (ATII)**

Le flux sanguin peut être augmenté par l'administration de différents agents vasoactifs, tels que l'angiotensine II (ATII), ou par des méthodes physiques, telles que l'hyperthermie (Jain, Venkatraman et al. 2007). L'angiotensine II est une molécule vasoactive qui permet d'augmenter la fixation du radioimmunoconjugué au sein des tumeurs solides. Elle permet une vasoconstriction des artéioles responsables de l'hypertension artériolaire. Cependant, les vaisseaux tumoraux ne possédant pas de muscles lisses ne sont pas atteints. Par conséquent on observe une augmentation du flux sanguin au sein de la tumeur. De nombreuses études ont démontré l'efficacité de l'ATII (Kinuya, Yokoyama et al. 1997).

- **Le VEGF et la normalisation vasculaire**

La structure et les fonctions perturbées de la vascularisation tumorale sont les principales causes de l'élévation de la pression interstitielle et de la distribution hétérogène des macromolécules d'anticorps au sein de la tumeur. Il a été démontré que les molécules anti-angiogéniques, comme les anticorps dirigés contre le VEGF (pour Vascular Endothelial growth Factor) ou le récepteur 2 du VEGF, permettent d'obtenir une normalisation transitoire de la vascularisation tumorale, appelée également "fenêtre de normalisation" (Jain 2005). Les vaisseaux sont moins tortueux, avec un diamètre réduit (Winkler, Kozin et al. 2004). On observe également une diminution de la pression interstitielle avec une meilleure pénétration et distribution des agents de chimiothérapie (Tong, Boucher et al. 2004). De plus, certaines études ont montré que la normalisation vasculaire pouvait réduire l'hypoxie tumorale, et donc sensibiliser la tumeur à l'irradiation. Les études qui permettraient de valider cette approche en RIT sont en cours.

- **Optimiser le passage de l'endothélium vasculaire**

La barrière de l'endothélium vasculaire est un facteur limitant la distribution des radioimmunoconjugués au sein de l'espace tumoral. Le passage des macromolécules comme les anticorps est étroitement régulé et restreint. Plusieurs agents vasoactifs ont été étudiés dans le but d'optimiser le transport des macromolécules, telles que l'interleukine 2 (IL-2)

(Hornick, Khawli et al. 1999 ; Nakamura and Kubo 1994 ; Nakamura and Kubo 1997), le facteur de nécrose tumorale (TNF α) (Folli, Pelegrin et al. 1993; Melton, Rowland et al. 1993) et la fraction C5a du complément (Kurizaki, Okazaki et al. 2002).

d. L'hyperthermie

De nombreuses études ont démontré l'efficacité de l'hyperthermie dans les protocoles de RIT. Cette stratégie permet d'augmenter le degré de fixation tumoral du radioimmunoconjugué et contribue à rendre sa distribution plus homogène. Elle radiosensibilise également les cellules tumorales et permet de détruire les cellules hypoxiques en phase S du cycle cellulaire (Kinuya, Yokoyama et al. 2004). L'équipe de Mittal a ainsi montré la faisabilité d'une hyperthermie de 42°C associée à l'administration d'un anticorps dirigé contre l'ACE humain (IMMU-4) et couplé à l'¹³¹I, chez des patients atteints d'un adénocarcinome colique métastatique. Néanmoins, une seule rémission partielle a été obtenue, avec une réduction des symptômes pour 33% des patients (Mittal, Zimmer et al. 1992). Un modèle murin de xénogreffe d'adénocarcinome colique métastatique a permis de montrer qu'une hyperthermie localisée (41,5°C) permet d'augmenter l'expression de l'antigène tumoral ciblée par l'anticorps NR-Lu-10, une glycoprotéine exprimée par les cellules épithéliales malignes, dans un modèle murin d'adénocarcinome colique. Cette étude montre que l'administration de l'anticorps NR-Lu-10 couplé à l'⁹⁰Y et associée à une hyperthermie de 43°C inhibe de façon significative la croissance tumorale par rapport au témoin non traité, pour une activité fixe de 0,925 MBq (25 μ Ci) (Wilder, Langmuir et al. 1993). Par ailleurs, une hyperthermie de 43°C, dans un modèle de mélanome (hamster) a permis de diminuer la pression interstitielle au niveau tumoral avec une atteinte du tissu tumoral (Leunig, Goetz et al. 1992). Néanmoins, il a été démontré dans un modèle de gliome (souris athymique), qu'une hyperthermie de 41,8°C, n'avait aucun effet sur la pression interstitielle (Hauck, Coffin et al. 1997). L'hyperthermie diminuerait également le catabolisme tumoral et augmenterait l'excrétion urinaire du radioimmunoconjugué (Hauck and Zalutsky 1998). Un protocole de RIT utilisant l'anticorps anti-ACE (IMMU-4) couplé à l'¹³¹I, associée à une hyperthermie localisée a été évalué dans une étude clinique de phase I/II, cependant la température et le temps d'exposition restent à optimiser en pré-cliniques (Mittal, Zimmer et al. 1996; Hauck and Zalutsky 2005).

La plupart des études évoquées dans cette partie se limitent au modèle animal, et demandent une plus grande optimisation des paramètres, avant d'envisager des tests cliniques.

2. Diminuer l'irradiation non spécifique

L'irradiation non spécifique est liée à une fixation du radioimmunoconjugué au niveau de sites non tumoraux et à leur catabolisme ou à leur lieu d'excrétion (Boswell and Brechbiel 2007). Les équipes de recherche visent donc à diminuer la toxicité hématologique, rénale, hépatique, par des mesures chimiques ou par l'ingénierie des anticorps. La greffe de cellules souches est une mesure également bien établie. Enfin, la RIT intra-cavitaire est une piste de plus en plus explorée pour venir cibler directement la tumeur, sans conséquences au niveau de la moelle osseuse.

a. L'administration intra-cavitaire

La toxicité hématologique est l'un des facteurs limitant les plus importants à considérer lors de la mise en place des protocoles de RIT. La première possibilité permettant de diminuer cette toxicité associée à une administration en systémique est de choisir la voie intra-cavitaire. Les études pré-cliniques et cliniques ont montré une concentration plus élevée des radioimmunoconjugués, au niveau tumoral durant les 24 premières heures qui suivent l'administration intra-péritonéale, comparé au même anticorps administré par voie sanguine. Au cours d'essais pré-cliniques, la voie intra-péritonéale a été utilisée pour administrer des vecteurs radiomarqués avec le ^{213}Bi (Garmestani, Milenic et al. 2005), l' ^{211}At (Larsen, Hoff et al. 1995) et l' ^{225}Ac (Borchardt, Yuan et al. 2003) pour le traitement des carcinomes coliques ou ovariens. La voie intrathécale a été également testée avec un vecteur couplé à l' ^{211}At pour le traitement de la méningite néoplasique (Zalutsky, McLendon et al. 1994). Enfin, l'injection au sein du volume de résection tumoral est une voie explorée dans le gliome résiduel (Zalutsky, Stabin et al. 1997). En clinique, l'administration intra-vésicale de l'anticorps HMFG2 spécifique de l'antigène MUC-1 et couplé à l' ^{111}In , a été réalisée, avec une fixation tumorale obtenue avec succès, dans le traitement du cancer de la vessie (Bamias, Bowles et al. 1993). Cette voie a été également testée avec l'administration de l'anticorps C595 couplé

au ^{67}Cu et dirigé également contre l'antigène MUC-1 (Hughes, Bishop et al. 2000). Au cours de cette étude, les taux de fixation sont cependant très variables d'un patient à l'autre, avec des taux moyens de fixation au niveau tumoral d'environ 80% de la dose injectée par gramme, 2h après l'administration du radioimmunoconjugué, ces résultats ne permettent pas de juger l'efficacité du traitement.

L'administration intra-cavitaire contribue à l'amélioration de la RIT en augmentant au niveau du site tumoral la concentration du radioimmunoconjugué. Cette technique permet ainsi de diminuer la toxicité hématologique et permet d'optimiser le ciblage tumoral (pour revue Aarts, Bleichrodt et al. 2008). Cette modalité d'administration s'applique au traitement des tumeurs solides présentes au sein d'une cavité péritonéale, vésicale ou de la paroi méningée.

b. Diminuer la toxicité rénale

L'accumulation de métabolites radioactifs après administration d'un radiopharmaceutique peut compromettre parfois l'efficacité du traitement. La majorité des protéines et peptides radiomarqués sont filtrés par le glomérule, réabsorbés par le tubule proximal et ensuite transportés vers le compartiment lysosomal où ils vont être métabolisés. Ces différents processus peuvent influencer le temps de résidence de métabolites radioactifs au niveau rénal après administration de radiopharmaceutiques.

Le glomérule rénal est constitué de pores de 75 angström permettant le passage de protéines et peptides possédant un PM inférieur à 25 kDa. Les analogues de la somatostatine et les fragments ScFv sont ainsi rapidement filtrés par le glomérule. Néanmoins, la filtration glomérulaire n'a pas lieu pour les fragments protéiques possédant un PM supérieur ($(\text{F(ab')}_2$, minibody, ou diabody) et viennent s'accumuler au niveau du rein. Après filtration glomérulaire, les protéines et peptides sont réabsorbés par le tubule proximal. Il est démontré qu'une interaction électrostatique entre la surface du tubule rénal chargée négativement et les portions cationiques des protéines peut être impliquée dans ce processus. L'administration d'un acide aminé basique (possédant des radicaux chargés positivement) permet de réduire l'accumulation de ces métabolites au niveau rénal. Ces acides aminés, comme la lysine ou l'arginine, viennent se fixer de manière compétitive pour les sites de fixation chargés négativement, au niveau de la surface du tubule proximal. Ils vont ainsi bloquer la charge négative de la membrane tubulaire et prévenir la liaison et par conséquent la réabsorption des

métabolites. Il est démontré que l'administration de polypeptides basiques comme la poly-L-lysine permet de diminuer la réabsorption rénale de métabolites radioactifs. L'efficacité de ces polypeptides est proportionnelle à la taille du métabolites (Behr, Sharkey et al. 1995; DePalatis, Frazier et al. 1995; Behr, Sharkey et al. 1997). Cette stratégie ne peut pas être appliquée dans toutes les situations. En effet, le groupe de Rutherford a testé la fixation au niveau rénal de deux fragments ScFv (anti-NCAM-SNE.7 et anti-CEA-MAb35) couplés au ^{67}Cu , associée à l'administration de lysine. La dose accumulée au niveau du glomérule a été inhibée à plus de 47% pour le fragment anti-CEA, mais inférieure à 10% pour le deuxième fragment testé. Ces résultats apportent une donnée supplémentaire quant à la fixation des catabolites au niveau rénal. Il semblerait que la charge nette de ces catabolites ne soit pas la seule cause responsable de la toxicité rénale (Rutherford, Smith et al. 1997). L'équipe de Melis a montré que le maléate, inhibiteur du cycle de Krebs, permettait de réduire la fixation de l' ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octréotide au niveau du tubule rénal. La réabsorption par le tubule rénal du peptide radiomarqué semble donc être également dépendant de l'énergie fournie par le cycle de Krebs (Melis, Krenning et al. 2005). Le mécanisme par lequel les métabolites sont réabsorbés par le tubule rénal n'est pas encore clairement élucidé. Néanmoins, le groupe de Jong a mis en évidence l'implication d'un complexe récepteur exprimé par le tubule rénal proximal, le complexe mégaline/cubuline. Le rôle de ce complexe est illustré par une diminution de la toxicité rénale après administration de l' ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octréotide dans un modèle murin déficient pour la mégaline (de Jong, Barone et al. 2005). Il est également démontré que la Gélofusine[®], soluté isotonique, obtenu à partir de collagène modifiée permet de diminuer de manière significative (45%) la fixation de l' ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octréotide au niveau rénal (Van Eerd, Vegt et al. 2006). La modification de la charge nette de fragments d'anticorps ou peptides radiomarqués permet également de réduire la toxicité rénale. En effet, l'équipe de Kobayashi a prouvé que la diminution du point isoélectrique d'un fragment Fab dirigé contre la sous-unité α du récepteur à l'IL-2 (Tac), permet d'accélérer l'excrétion urinaire de ses métabolites, après une administration intraveineuse chez la souris *nude* (Kobayashi, Le et al. 1999). Enfin, l'utilisation d'agents pharmaceutiques chélatant comme le DMPS (2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid) ou le DMSA (meso-2,3-dimercaptosuccinic acid) va permettre de limiter la toxicité rénale des anticorps couplés à l' ^{225}Ac . La toxicité rénale des produits de dégradation de ce type de radiopharmaceutiques est associée à la libération de ^{213}Bi ayant un tropisme important pour le rein (Jaggi, Kappel et al. 2005). L'intérêt de cette association a été démontrée chez le singe dans une étude de toxicité et de pharmacocinétique de l'anticorps HuM195- ^{225}Ac (Miederer, McDevitt et al. 2004).

3. Bilan pré-thérapeutique par imagerie et dosimétrie

Caractériser une tumeur avant la mise en place d'un traitement par radioimmunothérapie est aujourd'hui indispensable pour pouvoir augmenter l'efficacité du traitement. Par ailleurs, lorsqu'un acte utilisant des rayonnements ionisants en médecine est pratiqué, le praticien ayant réalisé l'examen doit pouvoir préciser quelle est la dose exacte délivrée aux tissus. Cette dose va dépendre de plusieurs paramètres dont l'activité totale injectée, la demi-vie du radioélément, la nature de son rayonnement, la pharmacocinétique et la biodistribution du radiopharmaceutique injecté. La dosimétrie et la caractérisation de la tumeur sont réalisées à partir de techniques d'imagerie médicale.

La technique d'imagerie la plus récente est la technique de tomographie par émission de positons (TEP) ou PET (abréviation anglaise, *Positron Emission Tomography*), qui présente plusieurs avantages pour localiser les tumeurs en raison notamment de sa sensibilité. Le traceur le plus souvent utilisé est le fluor 18 (^{18}F) couplé à une molécule de glucose pour former le ^{18}F -2-deoxy-2-Fluoro-D-glucose (^{18}F -FDG). Le ^{18}F représente à lui seul 90% de l'utilisation TEP, loin devant les autres radio-isotopes émetteurs de positons comme le ^{64}Cu , le ^{68}Ga , ou l' ^{124}I . Le (^{18}F -FDG) est semblable au glucose. Il se fixe au niveau des tissus qui consomment de grandes quantités de glucose comme les tissus cancéreux, dont le métabolisme glucidique est modifié. Le ^{18}F dont la demi-vie est de 2h émet de façon temporaire des rayonnements que l'on peut suivre dans l'organisme du patient grâce à une caméra à coïncidences, la caméra TEP. L'atome radioactif se désintègre en émettant un positon. Celui-ci va s'annihiler avec un électron du milieu, après un très court parcours. Cette annihilation produit 2 photons γ de 511 keV qui partent dans une même direction (selon un angle de 180°). Ce phénomène rend possible le traitement tomographique des données. En effet, les capteurs situés tout autour du patient détectent les photons d'annihilation en coïncidence, c'est-à-dire arrivant au même instant, permettant d'identifier la ligne sur laquelle se trouve l'émission des photons. Un système informatique reconstitue ensuite les images de la répartition du traceur au niveau d'une partie ou de la totalité du corps en 3D. La radioactivité provient du traceur injecté au patient, les images obtenues sont donc dites d'émission. Néanmoins, aujourd'hui la plupart des caméras TEP sont couplées à une tomodensitométrie à rayons X. Ce qui permet de superposer l'image fonctionnelle (image TEP) à une localisation précise dans le corps (image anatomique de haute résolution grâce au scanner).

Avec la multiplication à court et moyen terme des systèmes de TEP en cancérologie clinique, il est possible d'envisager le développement de fragments d'anticorps humanisés et marqués avec des radionucléides émetteurs de positons pour l'immunoscintigraphie des petites tumeurs dans les situations cliniques où le FDG est négatif. De plus ces radioimmunoconjugués seront très utiles en dosimétrie pré-thérapeutique. Dans ce cadre, les radionucléides ayant une demi-vie de l'ordre de 24h sont préférables. En effet, pour les tumeurs solides, le rapport optimal tumeur sur sang avec les anticorps radiomarqués n'est souvent obtenu qu'après quelques jours. Ainsi, les émetteurs de positons, avec une demi-vie longue semblent plus adaptés. Pour cette raison, un des premiers émetteurs de positons à avoir été utilisé pour le marquage d'anticorps a été l' ^{124}I (demi-vie = 101h ou 4,2 jours). Il a en outre l'avantage de se comporter chimiquement comme les autres isotopes de l'iode. Cependant, la plupart des isotopes utilisés en RIT sont des métaux et quelques différences d'accumulation dans les tissus ont été observées entre les anticorps marqués à l'iode et ceux radiomarqués avec des radiométaux comme l' ^{111}In . Cela est dû à la dégradation et à la déshalogénéation rapide des anticorps marqués à l'iode après internalisation. Par conséquent, les anticorps marqués à l' ^{124}I peuvent ne pas toujours convenir pour une mesure exacte de la biodistribution. Comme alternative, l' ^{86}Y (demi-vie = 14,7 h) est un émetteur de positons bien adapté à une étude dosimétrique avant une radioimmunothérapie réalisée avec un anticorps marqué à l' ^{90}Y .

4. Les associations thérapeutiques

L'idée de combiner différentes modalités thérapeutiques pour la prise en charge des cancers apparaît comme une approche séduisante. Les associations de chimiothérapie/radiothérapie externe ou chimiothérapie/immunothérapie constituent des standards thérapeutiques dans certaines indications. Le but d'une association thérapeutique est d'améliorer le résultat thérapeutique, qui dépend de la réponse tumorale et des lésions au niveau des tissus sains. L'intérêt d'associer la RIT est sans doute supérieur pour les tumeurs solides relativement radiorésistantes que pour les tumeurs hématologiques. Associer l'irradiation à bas débit de dose délivrée par la RIT à des molécules de chimiothérapie potentiellement radiosensibilisantes comme le paclitaxel, la doxorubicine ou la gemcitabine apparaît établi avec des effets anti-tumoraux au niveau cellulaire, animal et clinique (Kraeber-

Bodere, Sai-Maurel et al. 2002 ; Supiot, Thillays et al. 2007;Li, Kinuya et al. 2002 ; Burke, DeNardo et al. 2002).

Les associations sont d'autant plus prometteuses que la toxicité des agents ne s'additionnent pas. L'association de la RIT aux nouveaux agents thérapeutiques comme les agents anti-angiogéniques apparaît également prometteuse. Une autre approche à explorer est la stimulation du système immunitaire à la recherche de l'effet abscopal démontré pour la RIT externe (Blanquicett, Saif et al. 2005).

C. Nouvelles perspectives thérapeutiques en RIT alpha et bêta : le syndecan-1 et l'endothélium vasculaire

I. Le ciblage du syndecan-1 dans le cancer du sein

Le syndecan-1 (CD138), surexprimé par les cellules myélomateuses est une molécule actuellement utilisée pour le traitement et le diagnostic du myélome multiple. Cet antigène est également associé à d'autres pathologies dont le cancer du sein, de la prostate, du colon ou hépatocellulaire. Dans le carcinome mammaire, le syndecan-1 est associé à un facteur de mauvais pronostic et un phénotype agressif. Il est décrit également que le carcinome mammaire est une tumeur solide radiosensible (Delaloge and Marsiglia 2005). Au cours de mon travail de thèse, nous avons développé un modèle de ciblage du syndecan-1 en RIT β du cancer du sein. Il était également intéressant d'étudier le potentiel thérapeutique des rayonnements α sur ce modèle de tumeur solide, afin de mesurer l'impact de ce type de rayonnements dans le traitement de la maladie résiduelle.

1. Le cancer du sein : rappels épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques

a. Données épidémiologiques

En France, le cancer du sein est le plus fréquent des cancers chez la femme et la première cause de mortalité féminine par cancer (20,2%). Environ une femme sur dix présentera un cancer du sein au cours de sa vie. En Europe en 2006, 331392 nouveaux cas ont été diagnostiqués, avec 129900 décès. Rare avant 30 ans, l'incidence croît rapidement entre 30 et 50 ans. En 2006, en France, l'incidence est de 127,42 pour 10×10^4 avec une mortalité de 25,9 pour 10×10^4 (Observatoire Européen du Cancer-OEC).

Le cancer du sein est une maladie hétérogène avec des variations substantielles des temps de croissance et des développements métastatiques d'une patiente à l'autre. Il est donc intéressant de mettre en évidence des critères cliniques, biologiques et histopathologiques qui permettent de distinguer les patientes à pronostic très favorable, qui bénéficieront de thérapeutiques moins agressives, des patientes à pronostic d'emblée défavorable, qui devront être lourdement traitées.

Le décès par cancer du sein est causé par une dissémination métastatique, exceptionnellement par un développement local ou régional. Le risque de métastases persiste jusqu'à 15, parfois 20 ans après l'exérèse tumorale. Le taux moyen de survie sans rechute à 5 ans est d'environ 60%. C'est la première cause de mortalité des femmes entre 50 et 69 ans.

b. Les aspects cliniques

Il existe de nombreux types histologiques de cancer du sein. Ils se développent dans la glande mammaire, c'est pourquoi la majorité des cancers du sein sont des adénocarcinomes. Chacun d'entre eux porte le nom de la zone mammaire dans laquelle les cellules cancéreuses commencent à se développer. Le carcinome canalaire est le type le plus fréquent. Il naît dans les cellules canalaire. Le carcinome lobulaire est un autre type de cancer du sein qui débute dans les lobes ou les lobules. Si une tumeur demeure dans le canal ou le lobule, il s'agit d'un carcinome *in situ* (cancer canalaire *in situ* ou CCIS et cancer lobulaire *in situ* ou CLIS), mais une tumeur qui s'étend à l'extérieur du canal ou du lobule est un carcinome infiltrant ou invasif. Les cancers canalaire infiltrant (CCI) est la forme la plus fréquente (75% des cas), le cancer lobulaire infiltrant (CLI) étant beaucoup plus rare (10% des cas). Les cancers infiltrants peuvent se disséminer vers les ganglions (les ganglions axillaires sont les plus souvent touchés) ou d'autres parties du corps, à l'origine de tumeurs secondaires ou métastases. Les sites les plus susceptibles d'être le siège de métastases sont par ordre de fréquence, le squelette avec des métastases ostéolytiques, l'appareil respiratoire, sous la forme de nodules pulmonaires multiples ou d'une lymphangite carcinomateuse, le foie et enfin le cerveau et les méninges. Les cancers *in situ* sont le plus souvent découverts lors d'un examen de dépistage systématique par mammographie. Dans certains cas, ce cancer *in situ* peut être révélé par un écoulement de sang du mamelon ou un eczéma à ce niveau. La maladie de Paget est un cancer qui se développe au niveau des canaux galactophores, ayant un tropisme cutané se manifestant par un pseudo-eczéma du mamelon. Elle témoigne d'un cancer infiltrant ou d'un carcinome intracanaire du sein.

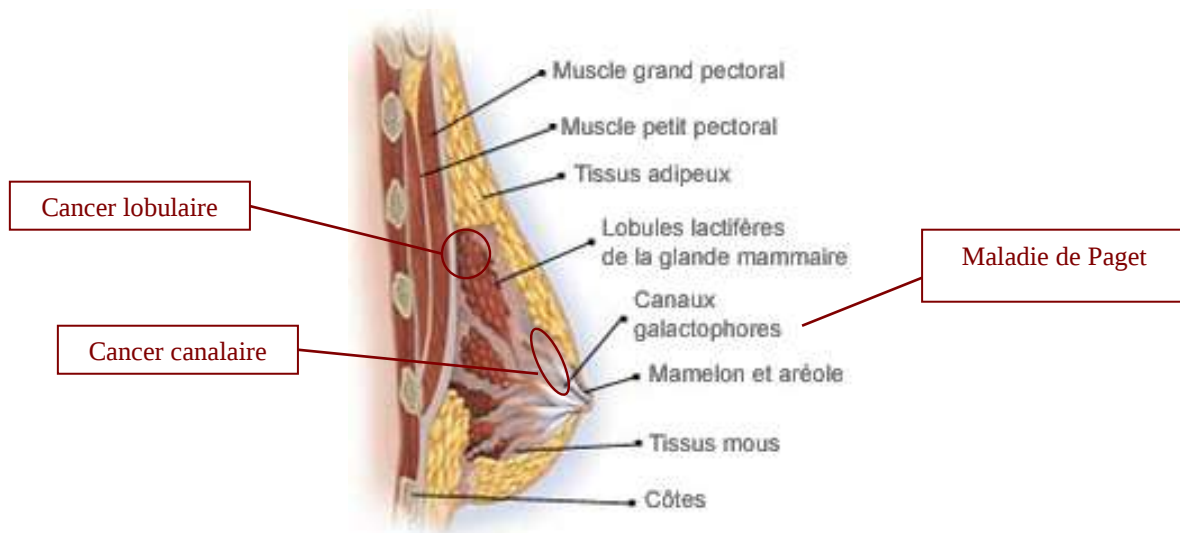


Figure 11. Les différents types de cancers du sein.

c. La progression tumorale

Le drainage lymphatique du sein se fait principalement vers les ganglions axillaires qui sont atteints s'il y a propagation du carcinome. Le risque d'envahissement ganglionnaire est nul dans les CCIS et, par la suite croît proportionnellement avec la taille du cancer primitif. Le nombre de ganglions envahis reste le meilleur facteur prédictif de la survie et du risque de maladie résiduelle.

Le risque métastatique, faible pour des tumeurs de moins de 5 mm, croît proportionnellement avec la taille de la tumeur primitive et le nombre de ganglions axillaires pathologiques. En phase métastatique, la maladie est incurable, la durée médiane de survie est d'environ deux ans. L'évaluation du pronostic est un élément essentiel de la prise en charge des patients. Les paramètres seront essentiellement cliniques. Le clinicien évaluera dans un premier temps le délai d'apparition des métastases à partir de la date du diagnostique, il peut également chercher à localiser les métastases, étroitement liées à l'évolution (les métastases osseuses sont plus favorables que des métastases viscérales). La masse tumorale joue également un rôle majeur. Une patiente ayant de multiples localisations encéphaliques a une espérance de vie de six mois, tandis que des survies longues sont possibles avec une métastase osseuse, isolée et traitée. Enfin la détermination des marqueurs tumoraux (ACE, MUC1) est également corrélée avec la masse tumorale. L'évolution des marqueurs sériques permet d'évaluer la réponse thérapeutique.

2. Les thérapies actuelles et émergentes

a. Le traitement des cancers localisés

Historiquement, la chirurgie d'exérèse est le traitement initial des cancers localisés du sein. Depuis les années 70, la chirurgie est devenue plus conservatrice et s'intègre dans une approche pluridisciplinaire, avec les techniques du ganglion sentinelle ou la radiothérapie. Dans certains cas, le développement de la technique du ganglion sentinelle (ganglions axillaires pathologiques), beaucoup moins agressive, permet de réduire le recours à la chirurgie (Giuliano, Jones et al. 1997; Krag, Weaver et al. 1998). Cette technique consiste à injecter un traceur lymphophile (isotope ou colorant bleu) au contact de la tumeur, dont la diffusion dans les canaux lymphatiques du sein permet l'identification du ganglion sentinelle, premier ganglion drainant la tumeur mammaire et donc le premier relais lymphatique potentiellement métastatique (Classe, Bordes et al. 2009).

Plusieurs études cliniques ont confirmé que la radiothérapie postopératoire permettait une réduction des récidives locales et avait un impact sur la survie des malades (Fisher, Anderson et al. 1995; Park, Mitsumori et al. 2000). Elle peut cependant augmenter le risque de décès à long terme par maladie cardiovasculaire (Harris 2008; Demirci, Nam et al. 2009).

b. Les traitements adjuvants

La prescription d'un traitement systémique après la chirurgie, en l'absence de toute maladie métastatique patente, constitue un traitement adjuvant. La chimiothérapie est devenue un traitement standard, pour une majorité de patientes traitées pour un cancer du sein. Elle reste plus efficace en pré- qu'en postménopause. L'estrogénodépendance de 70% des cancers du sein est une opportunité à privilégier chaque fois que la situation le permet, à savoir dès qu'il y a expression de récepteurs hormonaux au niveau des cellules tumorales. L'objectif thérapeutique est de priver le tissu tumoral d'estrogènes, soit en supprimant la production centrale (ovariectomie, agoniste LH-RH) ou la synthèse intra-tissulaire (inhibiteurs de l'aromatase), soit en occupant le site de liaison intra-cellulaire (*selective receptor modulators*).

C. Les thérapies ciblées

Le cancer du sein est décrit comme étant radio- et chimiosensible (Delaloge and Marsiglia 2005). Cependant malgré le développement de l'arsenal thérapeutique et la réalisation de nouveaux protocoles cliniques, le traitement des formes métastatiques n'a pas fourni de réels progrès (Jemal, Murray et al. 2005). En effet, les cellules tumorales deviennent de plus en plus résistantes à la chimiothérapie. L'utilisation de la radiothérapie reste limitée au traitement des sites métastatiques, majoritairement osseux, compte tenu de sa toxicité. L'immunothérapie ou la RIT semblent beaucoup plus prometteuses pour le traitement de ce type de tumeur (Clarke, Lee et al. 2000; Sharkey and Goldenberg 2005). Plusieurs cibles antigéniques ont été identifiées, dont la molécule HER-2, le MUC-1, l'ACE et le syndecan-1. Nous traiterons uniquement le syndecan-1, faisant l'objet de mon travail de thèse.

II. Le syndecan-1 (CD138)

1. Généralités

Le syndecan-1 fut découvert en 1983 par Rapraeger et Bernfield dans une lignée cellulaire murine d'épithélium mammaire. Nommé du grec syndein "attaché ensemble", il constitue le premier membre d'une famille de quatre, numérotées en fonction de la chronologie de leur découverte. Le syndecan-1 est également nommé syndecan ou CD138, le syndecan-2 fibroglycan, le syndecan-3 N-syndecan et le syndecan-4 amphiglycan. Les cellules de l'organisme expriment probablement toutes au moins l'un des quatre syndecans. Le syndecan-1 est observé durant l'embryogenèse dès le stade de blastocyste. Après la gastrulation, il prédomine dans l'ectoderme et l'endoderme qui donneront naissance aux tissus épithéliaux. Il est également exprimé dans les cellules mésenchymateuses des tissus embryonnaires précurseurs des dents, des reins, des poumons, des membres. Chez l'adulte, il prédomine au niveau des cellules épithéliales, en particulier au niveau des jonctions intercellulaires des épithéliums stratifiés. Il est faiblement exprimé par les fibroblastes et les cellules endothéliales. On le retrouve enfin sur les plasmocytes matures et les cellules lymphoïdes pré-B. Le syndecan-2 se localise plus spécifiquement à la surface des fibroblastes, le syndecan-3 est exprimé dans le tissu nerveux et le syndecan-4 dans les tissus conjonctifs.

2. Structure

Le syndecan-1 comme tous les protéoglycanes, se compose d'un cœur protéique sur lequel s'attachent des polymères de carbonhydrates ou glycosaminoglycanes (Couchman 2003). Cette partie protéique centrale est constituée d'une extrémité N-terminale, d'un domaine extra-cellulaire, d'une partie transmembranaire hydrophobe unique et d'une courte extrémité C-terminale intra-cytoplasmique (figure 12).

La partie intra-cytoplasmique, fortement conservée, contient deux séquences C1 et C2 similaires à celles de la drosophile. La séquence C1 est composée de 13 acides aminés situés immédiatement après le domaine transmembranaire et contient une séquence pour l'ancrage des protéines contenant un domaine FERM. La séquence C2 est un térapeptide situé à l'extrémité de la protéine qui reconnaît les domaines PDZ de nombreuses protéines en particulier, la synectine, la synténine et la synbidine (Couchman 2003; Tkachenko, Rhodes et al. 2005). C1 et C2 sont reliées par une région variable (V), unique pour chaque membre de la famille des syndecans, mais hautement conservée entre les différentes espèces orthologues. Il semble que cette région variable soit impliquée dans la prolifération cellulaire (Chakravarti, Sapountzi et al. 2005) .

La partie extracellulaire du syndecan-1 contient trois sites sérine glycine proches de l'extrémité N-terminale qui permettent l'ancrage des chaînes héparane-sulfate (HS) et deux autres sites proches de la région transmembranaire pour celui des chaînes chondroïtine-sulfates (CS) (Bernfield, Kokenyesi et al. 1992). Ces chaînes glycosaminoglycanes sont des polymères de disaccharides acétylés et sulfatés de façon extrêmement variable, ce qui leur offre d'innombrables possibilités de liaison et d'interaction.

QuickTime™ et un
 lecteur sont requis pour visionner cette image.

Figure 12. Structure générale du syndecan-1

3. Régulation

La dégradation du syndecan-1 s'effectue par endocytose ou par un clivage de sa partie extracellulaire. Ce clivage emporte à la fois le coeur protéique et les chaînes glycosaminoglycanes permettant au fragment libre de conserver une activité biologique. Il peut être induit par des enzymes comme les métalloprotéases de la matrice (MMP), la thrombine ou l'élastase, ou par un stress cellulaire secondaire à des contraintes mécaniques ou des facteurs de croissance (Fitzgerald, Wang et al. 2000; Brule, Charnaux et al. 2006). La régulation transcriptionnelle est encore mal connue. La région promotrice du gène du syndecan-1 comporte une boîte TATA et une boîte CAAT sur lesquelles peuvent se fixer de nombreux facteurs de transcription, en particulier le NF-kappa B.

4. Fonctions

Les chaînes héparane sulfate sont essentielles au fonctionnement du syndecan-1 (Sasisekharan, Shriver et al. 2002). Elles vont lui permettre de se lier à de nombreux facteurs de croissance, comme le *basic Fibroblast Growth Factor* ou bFGF, l'*Hepatocyte Growth Factor* ou HGF, le *Vascular Endothelial Growth Factor* ou VEGF et le *Platelet Derived*

Growth Factor ou PDGF (Bernfield, Gotte et al. 1999), des protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine ou le collagène, des molécules participant à l'adhésion cellulaire telle que N-CAM ou P-CAM, des enzymes comme l'acétylcholinestérase, ou des facteurs de la coagulation comme le facteur tissulaire (Carey 1997).

Ces longues chaînes HS lui permettent de capter et de rapprocher ces différentes molécules de la surface cellulaire et d'en augmenter la concentration à proximité du récepteur. Elles créent ainsi un gradient de cytokines (ou chimiokines) au niveau de l'endothélium. L'équipe de Marshall a ainsi démontré que le syndecan-1 était responsable de la formation d'un gradient de concentration d'IL-8 au niveau de la surface endothéliale (Marshall, Ramdin et al. 2003).

Le syndecan-1 joue également le rôle de co-récepteur dans des processus tels que la morphogenèse, la réparation tissulaire, le développement tumoral ainsi que dans le métabolisme énergétique (Bernfield, Gotte et al. 1999) et l'inflammation (Gotte 2003).

QuickTime™ et un
décodeur sont
nécessaires pour visionner cette image.

Figure 13. Fonctions biologiques du syndecan-1

5. Syndecan-1 et transition épithélio-mésenchymateuse

La possibilité pour une cellule de passer d'une conformation épithéliale à une conformation mésenchymateuse est un phénomène identifié par Elisabeth Hay dans les années 80 (Hay 2005). Au cours de cette transition, les cellules épithéliales acquièrent des propriétés invasives et migratoires, et subissent des changements morphologiques caractéristiques. Les mécanismes moléculaires et les gènes impliqués ont été étudiés dans de multiples modèles *in vitro* et *in vivo*. Ce changement phénotypique reproduit un mécanisme physiologique qui a normalement lieu durant l'embryogenèse. Il se manifeste par la perte de la polarisation de la cellule épithéliale, la suppression de l'expression de l'E-cadherine et l'expression de marqueurs de type mésothélial comme la vimentine (Guarino, Rubino et al. 2007).

La perte de l'expression de l'E-cadherine dans la progression tumorale a été vérifiée dans les cancers de la prostate (Contreras, Ledezma et al. 2009), de la vessie (Clairotte, Lascombe et al. 2006) et aussi dans les cancers du sein (Gotte, Kersting et al. 2007). Elle est due à des modifications épigénétiques (méthylation du promoteur), des mutations du gène, mais également par l'intervention de certaines voies de signalisation. Les divers membres de la famille du TGF β semblent clairement impliqués, bien que les données soient surtout issues de quelques modèles expérimentaux. La transition épithélio-mésenchymateuse est une notion désormais admise en carcinogenèse (Gos, Miloszezwska et al. 2009).

Le syndecan-1 participe à la transition épithélio-mésenchymateuse en raison de sa localisation privilégiée au sein des jonctions intercellulaires et de ses liens avec la matrice. Le groupe de Kato a transfecté une lignée cellulaire murine d'épithélium mammaire, la NMuMG, avec l'ARNm interférant du syndecan-1. Il obtient deux types de lignées, un type épithélial, partiellement déficient en syndecan-1 et un type fusiforme fortement déficient. Le type épithélial se comporte en culture de la même façon que les cellules normales et forme des îlots de cellules polygonales jusqu'à l'obtention d'une couche monocellulaire à confluence. Le type fusiforme qui conserve, malgré son apparence, les marqueurs de différenciation mammaire, est capable de croître sans ancrage, de migrer, d'envahir le gel de collagène et de former plusieurs couches cellulaires sans inhibition de contact. Les β 1intégrines de ces cellules, réarrangées différemment, sont normalement exprimées au contraire de l'E-cadhérine dont le niveau est effondré. Les cellules fortement déficientes en syndecan-1 acquièrent donc non seulement les caractéristiques morphologiques de la cellule

mésenchymateuse mais également ses propriétés comportementales et moléculaires. Etant donné le nombre de constituants nécessaires à la mise en place des jonctions intercellulaires, la réexpression du syndecan-1 dans les cellules mésenchymateuses déficientes ne permet pas de leur faire reprendre un morphotype épithélial (Kato, Saunders et al. 1995). Cette expérience illustre bien le rôle essentiel du syndecan-1 dans le maintien de la morphologie de la cellule épithéliale et dans la transition épithélio-mésenchymateuse. La disparition du syndecan-1 épithélial est un événement précoce et progressif qui débute dans les lésions dysplasiques et se poursuit dans les carcinomes invasifs.

6. Expression du syndecan-1 dans le carcinome mammaire et valeur pronostique

Le tissu mammaire non pathologique exprime le syndecan-1 au niveau de la partie baso-latérale des cellules de l'épithélium canalaire, mais ne l'exprime pas dans les cellules lobulaires ni dans le stroma. Le syndecan-1 est une protéine ubiquitaire dont les modifications d'expression lors de la transformation maligne accompagnent l'acquisition de propriétés agressives. Ces caractéristiques soulèvent la question de la validité du syndecan-1 comme marqueur pronostique. Les résultats fournis par les études évaluant la relation existante entre l'expression du syndecan-1 et l'agressivité phénotypique du carcinome mammaire restent cependant très controversés.

D'après le groupe de Loussouarn, les carcinomes canaux infiltrants localisés (sans atteinte ganglionnaire) ont une expression épithéliale de syndecan-1 d'autant plus abaissée que la tumeur est indifférenciée. Cette perte d'expression serait pour eux un facteur de mauvais pronostic en analyse multivariée (Loussouarn, Campion et al. 2008). Le groupe de Stanley fut le premier à décrire une expression du syndecan-1 majoritaire au niveau du stroma (90%) chez des patients atteints d'un cancer du sein infiltrant, cependant le nombre de patients (n=20) inclus dans cette étude, était insuffisant pour pouvoir évaluer la valeur pronostique du syndecan-1 (Stanley, Stanley et al. 1999). Les données expérimentales et cliniques ont montré ensuite que l'expression du syndecan-1 au niveau du stroma favorisait la croissance tumorale *in vivo* et l'angiogenèse (Maeda, Desouky et al. 2006 ; Maeda, Alexander et al. 2004). Les deux autres études qui ont suivi sont contradictoires. La première menée par l'équipe de Barbareschi en 2003, a montré que l'expression stromale du syndecan-1 ne

pouvait pas être considérée comme un facteur de mauvais pronostic. L'expression épithéliale, au contraire, corrélée aux facteurs de mauvais pronostic classiques de cette pathologie : absence de récepteurs aux oestrogènes, grade histologique élevé, atteinte ganglionnaire et surexpression du récepteur HER2, était défavorable (Barbareschi, Maisonneuve et al. 2003). Leivonen en 2004, montre que la perte d'expression au niveau du stroma peut être considérée comme un facteur de mauvais pronostic (Leivonen, Lundin et al. 2004). Ces résultats inattendus portent sur de vastes cohortes, même si leur hétérogénéité peut être largement critiquée. Il est difficile de ressortir un message clair de ces études. Cependant, la majorité des résultats associent l'expression du syndecan-1 à un facteur de mauvais pronostic. La valeur de l'expression épithéliale et stromale reste à démontrer, le pourcentage d'expression est très variable. Par ailleurs, il ne semble pas exister de lien étroit avec l'expression des récepteurs hormonaux (tableau 4). De plus amples essais sont nécessaires pour évaluer cette valeur pronostique sur de plus grands effectifs, incluant des patients atteints de cancer du sein d'origine histologique variés, et ayant reçu différents types de traitements.

7. Le syndecan-1 : intérêt du ciblage en RIT

L'anticorps B-B4 spécifique du CD138 humain, que nous avons utilisé durant ce travail de thèse, est l'un des anticorps anti-CD138 les plus employés en immunohistochimie. Son utilisation a déjà été élargie à la pratique clinique. Couplé à un anti-mitotique, il détruit électivement les plasmocytes dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (Tassone, Goldmacher et al. 2004). Son association à un radiopharmaceutique émetteur α ou β permet d'obtenir une puissante activité cytotoxique *in vitro* sur les plasmocytes (Supiot, Faivre-Chauvet et al. 2002). La surexpression du syndecan-1 au niveau de nombreux tissus tumoraux, tels que le carcinome mammaire, pulmonaire, hépatique, et prostatique est démontrée (Mennerich, Vogel et al. 2004). Cela permet d'envisager l'utilisation d'un seul anticorps pour traiter plusieurs types de cancers. Sa concentration dans le stroma et l'hypervascularisation tumorale font espérer une biodistribution de l'anticorps satisfaisante.

8. Syndecan-1 et myélome multiple

Le syndecan-1 (CD138) est un héparane sulfate également présent à la surface des plasmocytes normaux et myélomateux. Marqueur de la différenciation plasmocytaire, il permet la reconnaissance des plasmocytes en cytométrie, et leur purification. Des essais réalisés *in vitro* ont montré que les cellules de myélome étaient efficacement ciblées à l'aide de l'anticorps B-B4 spécifique du syndecan-1 exprimé sur les cellules tumorales de la totalité des patients atteints de myélome multiple (Supiot, Faivre-Chauvet et al. 2002). Un essai clinique de phase I/II à l'aide de l' ^{131}I , a été initié afin d'évaluer les doses thérapeutiques ainsi que les paramètres de biodistribution et de pharmacocinétique de l'anticorps B-B4. Cet essai est en cours, au sein du service de médecine nucléaire de Nantes. Bien que le nombre de patients inclus à l'heure actuelle reste insuffisant pour valider l'approche, certains patients ont eu un bénéfice thérapeutique aux plus faibles doses testées sans toxicité. Si ces résultats se confirment, il serait intéressant d'évaluer l'intérêt de la RIT alpha sur cette pathologie. Le myélome multiple est en effet une pathologie diffuse, où les cellules peuvent être isolées ou regroupées sous forme de petits clusters favorables à un ciblage à l'aide d'anticorps couplés à un émetteur alpha. Nous envisageons ces protocoles de RIT dans la prise en charge de la maladie résiduelle après un traitement de première ligne.

Référence bibliographique	Nb patients	Ac/seuil positivité	Expression en %	Corrélations anatomo-cliniques	Facteur pronostique de survie
Stanley (1999) ¹	20	Epithélial B-B4 : NA	45	-	-
		Stromal B-B4 : NA	90		
Barbareschi (2003) ²	254	Epithélial B-B4 : 10%	41,7	RH-,HER2+,grade histologique	Oui, défavorable
		Stromal B-B4 : 10%	50,8	-	Non
Leivonen (2004) ³	200	Epithélial B-B4 : 5%	61	RH-	Non
		Stromal B-B4 : 5%	67	RH+	
Baba (2006) ⁴	207	B-B4 : NA	26,1	T,N,RH-,grade histologique	Non
Gotte (2006) ⁵	37	Epithélial B-B4 : NA	43,2	-	-
		Stromal B-B4 : NA	33,3		
Loussouarn (2008) ⁶	80	Epithélial MI15 : 10%	61,25	Grade histologique	Oui, favorable
		Stromal MI15 : 10%	30	-	Non

Tableau 4. Expression du syndecan-1 dans le cancer du sein

Les travaux de 6 études sont rapportés dans ce tableau. Elles portent sur le cancer du sein invasif et traitent des corrélations entre le syndecan-1 et les données anatomo-cliniques ou de la survie. 1^{ère} colonne : nom de l'auteur principal et année de publication de l'étude. 2^{ème} colonne : nombre de patients étudiés. 3^{ème} colonne : anticorps utilisé et seuil de positivité (pourcentage de cellules positives) fixé pour l'interprétation de l'expression épithéliale du syndecan-1. Lorsque les données concernant l'expression épithéliale et l'expression stromale sont disponibles, la localisation est précisée. Le terme "non applicable" (NA) est indiqué lorsque les résultats sont basés sur une interprétation subjective de l'intensité de fixation. 4^{ème} colonne : pourcentage des patients présentant une expression épithéliale du syndecan-1. Lorsque les données concernant l'expression épithéliale et l'expression stromale sont disponibles, la localisation est précisée dans la colonne 3. 5^{ème} colonne : corrélations entre l'expression du syndecan-1 et les critères anatomo-cliniques. 6^{ème} colonne : corrélation entre l'expression du syndecan-1 et la survie ainsi que son impact favorable ou défavorable. Lorsque l'analyse multivariée n'a pas été faite, le caractère univarié de la corrélation est précisé.

Abréviations : **T** : Taille tumorale ; **RH** : Récepteur Hormonaux ; **NA** : Non Applicable ; **N** : statut ganglionnaire.

Références bibliographiques : ¹(Stanley, Stanley et al. 1999) ; ²(Barbareschi, Maisonneuve et al. 2003) ; ³(Leivonen, Lundin et al. 2004) ; ⁴(Baba, Swartz et al. 2006) ; ⁵(Gotte, Kersting et al. 2006) ; ⁶(Loussouarn, Campion et al. 2008).

III. Le ciblage de l'endothélium vasculaire en RIT α

L'angiogenèse est indispensable à la croissance tumorale et la formation de métastases. L'efficacité anti-tumorale de la thérapie anti-angiogénique est aujourd'hui démontrée (cfA.II.2). Les premières études visant à développer la thérapie anti-angiogénique, furent décevantes. Cependant, ces échecs ont permis de comprendre le transfert (*switch*) angiogénique. On nomme ainsi la conversion des cellules de la paroi des vaisseaux, les cellules endothéliales, habituellement dormantes, en cellules activées qui communiquent de façon nouvelle avec leur environnement. Les cellules endothéliales qui tapissent la paroi des vaisseaux sanguins présentent à leur surface des récepteurs distincts selon qu'elles constituent des veines ou des artères. Cette différenciation est stable et maintenue par la direction et la force du flux sanguin. Habituellement les cellules endothéliales sont à l'état dormant. Mais dans des contextes exceptionnels, comme l'obstruction d'un vaisseau ou la présence d'une tumeur, elles sont actives et prolifèrent. Ce changement d'état dit transfert angiogénique résulte de la production de nouveaux récepteurs, chacun spécifiquement adapté à de nouvelles molécules de l'environnement. Ainsi des récepteurs vont être couplés aux facteurs de croissance produits par les cellules tumorales, d'autres aux molécules qui vont guider la croissance des nouveaux vaisseaux. En conditions normales, ces cellules ne se renouvellent que tous les 2 ou 3 ans et sont recouvertes par d'autres cellules, les péricytes, qui stabilisent le vaisseau, réduisant sa perméabilité et régulent le flux sanguin. Dans une tumeur, les facteurs pro-angiogéniques prennent le dessus sous l'effet de multiples stimuli : manque d'O₂ (hypoxie), de glucose, baisse du pH, stress oxydatif. Sous l'effet de ces facteurs, les cellules endothéliales se divisent, migrent et établissent des ponts avec leurs voisines. Un réseau sinueux de capillaires instables, dilaté et poreux s'installe, conduisant à un flux sanguin paresseux et irrégulier. La pression dans le milieu environnant augmente, ralentissant la distribution des molécules thérapeutiques.

L'endoglin (CD105) est une protéine surexprimée par les cellules endothéliales en cours de différenciation. Il constitue un candidat potentiel pour la thérapie anti-angiogénique, l'imagerie tumorale et le diagnostique. Il est en effet exprimé majoritairement par les cellules endothéliales activées, dont le renouvellement au sein de la tumeur est beaucoup plus rapide que dans les tissus sains. Envisager le ciblage de l'endoglin en RIT α nous permet d'atteindre la néo-vascularisation tumorale tout en préservant les tissus sains environnants. Cette stratégie nous permet également de concilier les effets et propriétés des rayonnements α avec un

ciblage efficace de la tumeur. Ce chapitre expose les différentes propriétés structurales et biologiques du CD105, ainsi que les propriétés des rayonnements α justifiant le choix de cette association.

1. L'endoglin (CD105) : généralités

Le rôle de l'endoglin dans l'homéostasie vasculaire a été mis en évidence par la mutation de son gène, porté par le chromosome 9q34, responsable de la télangiectasie hémorragique héréditaire de type I. Cette pathologie est caractérisée par des dysplasies vasculaires, de fréquents épisodes d'épistaxis, des malformations artérioveineuses pulmonaires, cérébrales, et hépatiques (Letamendia, Lastres et al. 1998; Bertolino, Deckers et al. 2005; Bobik 2006). Marqueur des cellules endothéliales activées, il fait l'objet aujourd'hui d'études visant à détruire la vascularisation endothéliale tumorale.

2. Structure protéique du CD105

Le CD105 est une protéine transmembranaire homodimérique de 180 kDa exprimée à la surface cellulaire (Quackenbush and Letarte 1985; Gougos and Letarte 1988). Les domaines transmembranaires et intracellulaires portent 71% d'homologie avec les séquences propres aux bêtaglycanes. Il existe actuellement 2 isoformes (L et S) pour la molécule CD105 ayant la possibilité de fixer le TGF β (Pichuantes, Vera et al. 1997). Ces 2 isoformes diffèrent d'un point de vue structural. La forme L-CD105 est formée à partir de 633 acides aminés dont 47 au niveau du domaine cytoplasmique, à la différence de la forme S, qui est constituée de 600 acides aminés dont 14 au niveau de la région cytoplasmique. Il est démontré que la forme L est prédominante (Li, Hampson et al. 2000). Les régions transmembranaire et cytoplasmique du CD105 humain sont les plus conservées, avec 95 % d'homologie avec la forme murine.

3. Les fonctions biologiques du CD105

Suite à la découverte du CD105 par le groupe de Letarte (Quackenbush and Letarte 1985; Gougos and Letarte 1988), de nombreuses fonctions propres au CD105 ont été mises en évidence. La plupart d'entre elles sont associées à la voie de signalisation du TGF β . L'endoglin fait partie intégrante du complexe récepteur du TGF β (Transforming Growth Factor) (Cheifetz, Bellon et al. 1992), mais il peut également exister de façon indépendante au niveau de la surface cellulaire.

Les molécules de la famille du TGF β ainsi que leur récepteur constituent un système de signalisation complexe, associé au développement cellulaire et de nombreux processus physiologiques et pathologiques (Govinden 2003). La famille du TGF β comprend 3 isoformes, TGF β 1, 2 et 3, les activines et les protéines osseuses morphogéniques (BMP). Il existe sept récepteurs de type I (T β RI), 5 récepteurs de type II (T β RII), et 2 récepteurs de type III (T β RIII) (Bertolino, Deckers et al. 2005). Les récepteurs T β RI et II sont des récepteurs possédant une activité sérine/thréonine kinase, activité nécessaire à l'ensemble des réponses médiées par le TGF β (Letamendia, Lastres et al. 1998). Les récepteurs de type III, comme l'endoglin et les bêtaglycanes, ne possèdent pas d'activité enzymatique propre, ils participent simplement à la régulation du signal médié par le complexe TGF β . Le domaine extracellulaire de la molécule CD105 fixe le TGF β 1 et 3 avec une forte affinité (50 nM) (Cheifetz, Bellon et al. 1992). L'endoglin peut également se lier aux autres constituants du système tels que l'activine A et les protéines osseuses morphogénétiques telles que la BMP-7 et 2 (Bone Morphogenetic Protein) (Barbara, Wrana et al. 1999).

4. Expression du CD105

Le CD105 est principalement exprimé par les cellules endothéliales vasculaires. Cependant, d'autres types cellulaires dont les cellules musculaires lisses vasculaires (Adam, Clesham et al. 1998), les fibroblastes (St-Jacques, Cymerman et al. 1994), les macrophages (Lastres, Bellon et al. 1992), les cellules leucémiques pré-B et d'origine myélomonocytaire (Quackenbush and Letarte 1985; Kay, Bone et al. 2002), ainsi que les précurseurs érythroïdes (Buhring, Muller et al. 1991), expriment dans une moindre mesure l'endoglin (tableau 14).

On retrouve également un taux élevé de CD105 au niveau des syncytiotrophoblastes placentaires (Gougos, St Jacques et al. 1992). Le CD105 est ainsi retrouvé au niveau des cellules endothéliales des brèches vasculaires, lors du développement embryonnaire, au niveau des tissus inflammatoires et des tumeurs solides. Une corrélation entre la présence de facteurs clinico-pathologiques (présence de métastases) et l'expression du CD105 a été clairement établie (Nikolaos, Saluel et al. 2008). Il est reconnu que le facteur TGF β régule de façon positive l'expression de l'endoglin. Plusieurs équipes de recherche ont montré que cette condition était susceptible d'activer l'expression du CD105 par les cellules endothéliales vasculaires. Ce processus peut être également optimisé par l'expression du TGF β ou les phénomènes d'irradiation *in vitro*. Le TNF α au contraire, diminue l'expression du CD105 (Li, Sorensen et al. 1999).

Système (localisation)	Types cellulaires
cardiovasculaire	cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires
sanguin	moelle osseuse, fibroblastes (stroma), progéniteurs des cellules B, précurseurs érythroïdes
réiculo-endothélial	macrophages (pulpe rouge rate), monocytes activés, macrophages différenciés, cellules dendritiques (organes lymphoïdes)
génito-urinaire	cellules interstitielles extra-glomérulaires, cellules mésangiales glomérulaires, cellules basales des tubes séminifères
embryonnaire	mélanocytes, syncytiotrophoblastes placentaires, cellules mésenchymateuses cardiaques embryonnaires

Tableau 5. Expression de l'endoglin dans les tissus normaux humains

5. CD105 et angiogenèse

La surexpression de l'endoglin au niveau de l'endothélium de nombreux tissus tumoraux par rapport à l'endothélium de tissus sains, souligne son implication dans l'angiogenèse tumorale (Burrows, Derbyshire et al. 1995; Kumar, Wang et al. 1996; Bodey, Bodey et al. 1998). En effet, plusieurs études ayant utilisé différents anticorps spécifiques du CD105, ont révélé une forte expression au niveau de l'endothélium des tissus de carcinome mammaire, pulmonaire, ou prostatique (Bodey, Bodey et al. 1998; Kumar, Ghellal et al.

1999). La suppression de l'expression du CD105 par la lignée HUVEC (*Human Umbilical vein endothelial cells*), a permis de constater une profonde inhibition du processus angiogénique, soulignant le potentiel proangiogénique du CD105 au niveau des cellules endothéliales (Li, Hampson et al. 2000). Des études réalisées chez la souris *knockout* ont permis de confirmer cette hypothèse. Les souris qui n'expriment pas le CD105 souffrent de multiples défaillances vasculaires et cardiaques, souvent mortelles dès les premiers stades embryonnaires (Arthur, Ure et al. 2000; Bourdeau, Faughnan et al. 2000).

6. CD105 : facteur pronostique

La forme circulante du CD105 peut être utilisée comme un indicateur de progression tumorale et permet ainsi d'identifier les patients à risques, c'est-à-dire menacés de rechutes ou de formes métastatiques. Chez les patients atteints d'un carcinome mammaire, les taux de CD105 circulant sont particulièrement élevés par rapport aux tissus sains. Ce niveau est d'autant plus élevé lorsque les patients développent des métastases (Li, Guo et al. 2000). L'équipe de Takahashi a confirmé cette hypothèse en étudiant le sérum de patients atteints de cancer colorectal et du sein, et d'autres types de cancer (Takahashi, Kawanishi-Tabata et al. 2001a). La forme circulante du CD105 permet également de mesurer la réponse d'un individu au traitement anti-angiogénique.

7. Ciblage de l'endoglin en RIT α

Nous avons décrit précédemment les différentes propriétés physico-chimiques des rayonnements α . Ces propriétés conditionnent leur champ d'application, restreint au ciblage de cellules isolées ou micrométastases dans la prise en charge de la maladie résiduelle. Une étude évaluant le ciblage de l'endothélium vasculaire dans un modèle de micrométastases pulmonaires permet d'envisager une nouvelle piste thérapeutique (Kennel, Boll et al. 1999). Le parcours tissulaire de l'ordre de quelques dizaines de μm , offre la possibilité de cibler un espace restreint appartenant à l'environnement tumoral, sans atteindre les tissus sains environnant. Le ^{213}Bi est le radioélément le plus accessible actuellement en terme de coût et

de disponibilité. Cependant, sa courte demi-vie physique impose un accès rapide à la cible antigénique. Le ciblage de l'endothélium vasculaire tumoral va permettre d'atteindre la vascularisation tumorale rapidement après administration du radioimmunoconjugué par voie intraveineuse. L'endoglin (CD105) est un antigène surexprimé par les cellules endothéliales de nombreux tissus tumoraux par rapport à l'endothélium de tissus sains. Il constitue ainsi une cible thérapeutique potentielle, pour la RIT α utilisant le ^{213}Bi .

Le rôle du CD105 dans l'angiogenèse et la progression tumorale est aujourd'hui bien établi. Le ciblage de l'endoglin représente une piste de thérapie anti-angiogénique ainsi qu'un très bon marqueur pronostique. Néanmoins le mécanisme d'action par lequel il exerce son potentiel pro-angiogénique n'est pas encore élucidé.

RESULTATS

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Les protocoles de radioimmunothérapie utilisés en clinique s'effectuent dans la plupart des cas à l'aide d'émetteurs radioactifs bêta. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, ces émetteurs de faible TEL sont adaptés au ciblage des petites masses tumorales présentant à leur surface des densités d'antigènes élevées. Récemment, de nouvelles approches de RIT utilisant des radioéléments alpha se sont développées et sont accessibles au sein de notre laboratoire. Ces radioéléments alpha, de fort potentiel cytotoxique, permettent d'effectuer des irradiations localisées et entraînent une mortalité cellulaire avec moins de 10 particules à la surface des cellules.

Le cancer du sein est un carcinome radio- et chimiosensible, cependant malgré le développement de nouvelles approches thérapeutiques, la médiane de survie des patients ayant développé des métastases reste médiocre. Le syndecan-1 est un membre de la famille des protéoglycanes. Il est surexprimé par les cellules de myélome multiple et dans de nombreux types de carcinomes, dont celui du sein. L'anticorps B-B4 spécifique du syndecan-1 nous a permis d'envisager le ciblage du CD138 dans un modèle de xénogreffe de carcinome mammaire, en RIT α et β .

L'objectif principal de ce travail est d'évaluer la faisabilité d'une RIT β , à l'aide de l' ^{131}I , et d'une RIT α , à l'aide du ^{213}Bi , dans un modèle de xénogreffe chez la souris *nude*, mimant un stade de maladie résiduelle chez l'homme. Nous avons ainsi cherché à déterminer les paramètres de biodistribution de l'anticorps B-B4, les doses maximales tolérées, et la toxicité hématologique des deux types de rayonnements utilisés.

Résultats – Partie I :
RIT β du cancer du sein

A. Intérêt du modèle

La lignée MDA-MB-468 est une lignée humaine de cancer mammaire qui surexprime le syndecan-1, par rapport aux cellules saines (Matsuda, Maruyama et al. 2001). La culture de cette lignée est simple et aucune condition particulière n'est nécessaire. De plus, la prise des tumeurs sur souris *nude* est obtenue sans traitement hormonal substitutif.

Nous avons, dans un premier temps confirmé les caractéristiques de l'anticorps B-B4 spécifique du syndecan-1 humain par des techniques de fixation à l'équilibre. Nous avons ensuite déterminé l'affinité et le nombre d'antigènes exprimés à la surface de la lignée cellulaire MDA-MB-468. Une étude de biodistribution réalisée sur la souris *nude*, nous a permis ensuite d'évaluer le degré de fixation de l'anticorps entier couplé à l' ^{125}I . Les résultats obtenus nous ont encouragé à mettre en place une étude de RIT β sur souris *nude* greffées par la lignée MDA-MB-468.

B. Mise en place du modèle humain de cancer du sein

Comme nous l'avons précisé dans l'introduction, les caractéristiques d'un anticorps utilisé en radiothérapie ciblée conditionnent l'efficacité du traitement. La capacité de l'anticorps B-B4 à reconnaître le syndecan-1 exprimé à la surface de la lignée MDA-MB-468 a été préalablement évaluée au sein de notre équipe par un marquage au cytomètre (S. Supiot et S.Gouard).

I. Détermination du nombre de sites antigéniques et de l'affinité de l'anticorps B-B4

Nous avons entrepris de déterminer l'affinité de l'anticorps B-B4 par un test de fixation à l'équilibre en marquant l'anticorps B-B4 à l' ^{125}I . Nous avons obtenu un rendement de marquage de l'ordre de 96%, et une activité spécifique de 355 kBq/ μg (9,6 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) d'anticorps.

L'objectif de ce test est de mesurer la liaison spécifique à l'équilibre, lors de l'incubation de concentrations croissantes du ligand radioactif avec une quantité fixe de cellules, c'est-à-dire d'antigènes. Ainsi, l'anticorps B-B4 va se lier à des sites spécifiques

correspondant au syndecan-1 et à des sites non spécifiques ou autres marqueurs antigéniques présents dans le milieu d'incubation. La somme de la liaison spécifique et non spécifique constitue la liaison totale. Le test a été réalisé plusieurs fois, de façon à obtenir la concentration cellulaire optimale assurant la saturation de tous les sites antigéniques, nous permettant d'évaluer la fixation spécifique à l'équilibre. Nous avons choisi de travailler avec 5×10^4 cellules.

La liaison non spécifique est déterminée en présence d'un excès de ligand non radiomarké (100 fois plus), capable de déplacer la liaison spécifique de l'anticorps radiomarké. La radioactivité incorporée par les cellules dans ces conditions, rapportée à la concentration d'anticorps radiomarké, correspond alors à la fixation non spécifique.

L'affinité de l'anticorps B-B4 ainsi que le nombre de sites antigéniques exprimés par la lignée MDA-MB-468, ont été calculés en utilisant un modèle de régression non linéaire de type "one binding site". Les résultats sont représentés par la figure 14. L'affinité de l'anticorps B-B4 a été mesurée à 3,2 nM. La densité antigénique a été évaluée à $1,1 \times 10^4$ sites par cellule. En comparaison avec la densité antigénique obtenue sur la lignée U266 ($1,5 \times 10^5$), la lignée MDA-MB-468 exprime peu de sites antigéniques.

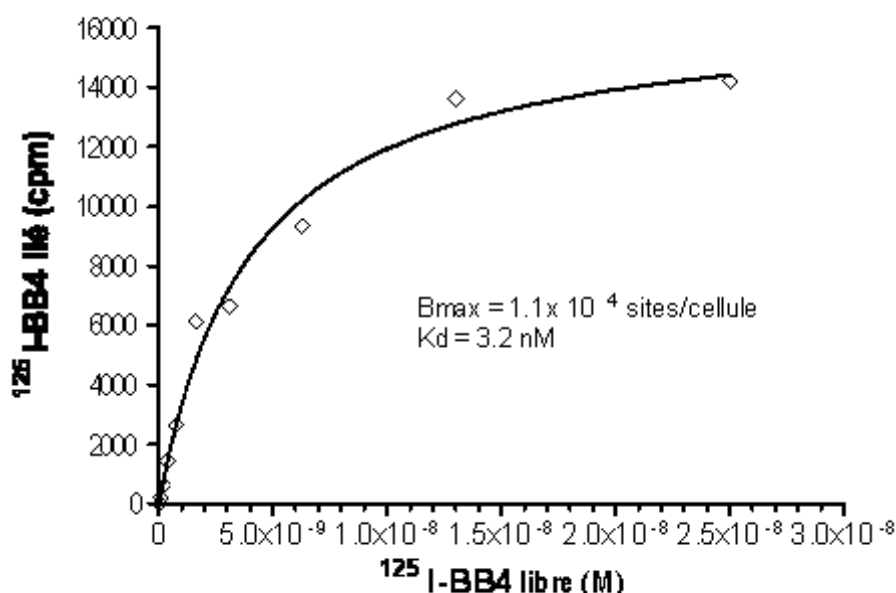


Figure 14. Etude de la liaison à l'équilibre de l'anticorps B-B4 marqué à l' ^{125}I sur la lignée cellulaire MDA-MB-468. Sont représentées les moyennes de fixation spécifique d'une expérience réalisée en triplicate. Cette figure représente la fixation spécifique en fonction de la fraction libre de l'anticorps B-B4 radiomarké à l' ^{125}I . La fixation non-spécifique du radioimmunoconjugué évaluée en excès d'anticorps non radiomarké a été soustraite à la fixation totale de l'anticorps radiomarké. Le B_{max} représente le nombre de sites par cellules et la constante de dissociation (K_d) correspond à l'inverse de la constante d'affinité.

II. Immunoréactivité de l'anticorps B-B4 radiomarké à l'¹²⁵I

Nous avons également vérifié que le couplage ne modifiait pas l'affinité et la liaison de l'anticorps B-B4 sur le syndecan-1, en évaluant l'immunoréactivité de l'anticorps après radiomarquage, par une méthode de référence, le test de Lindmo (Lindmo, Boven et al. 1984). Ce test consiste à réaliser un test de fixation à l'équilibre, on cherche à déterminer la fixation spécifique de l'anticorps radiomarké, en présence d'une gamme de concentrations cellulaires. La quantité d'anticorps présente dans le milieu reste constante. L'objectif de cette étude est de déterminer la quantité d'anticorps non fixée à la cellule lorsque le nombre de sites antigéniques est saturant.

Nous avons choisi une concentration cellulaire initiale de 100×10^6 cellules permettant d'obtenir un excès d'antigènes. Cette concentration a été déterminée à partir de la constante d'affinité et du Bmax. L'anticorps B-B4 préalablement radiomarké à l'¹²⁵I est testé à concentration fixe ($5,1 \times 10^{-10}$ M). Nous avons obtenu au cours de ce marquage, une activité spécifique de 185 kBq/ μ g (5 μ Ci/ μ g) d'anticorps, ainsi qu'un rendement de marquage de l'ordre de 99%. Le test a été réalisé en duplicate sur la lignée U266, de myélome multiple humain. La lignée U266 est beaucoup plus facile à mettre en œuvre, sachant qu'elle prolifère en suspension, contrairement à la lignée MDA-MB-468, qui est une lignée adhérente et qui demande un passage en trypsine, pour pouvoir être mise en suspension. L'ajout de la trypsine, peut ainsi venir modifier l'expression des différents antigènes à la surface cellulaire. Par ailleurs, nous avons démontré une faible expression du syndecan-1 sur la lignée MDA-MB-468. Ce dernier paramètre peut constituer un facteur limitant dans notre test, le test doit être en effet réalisé en présence d'un excès d'antigènes.

Les résultats nous ont permis de calculer un pourcentage de fixation de l'ordre de 79 %, selon un modèle de régression non linéaire. L'inverse de l'ordonnée à l'origine représente la fraction immunoréactive de l'anticorps B-B4 radiomarké à l'¹²⁵I (figure 15).

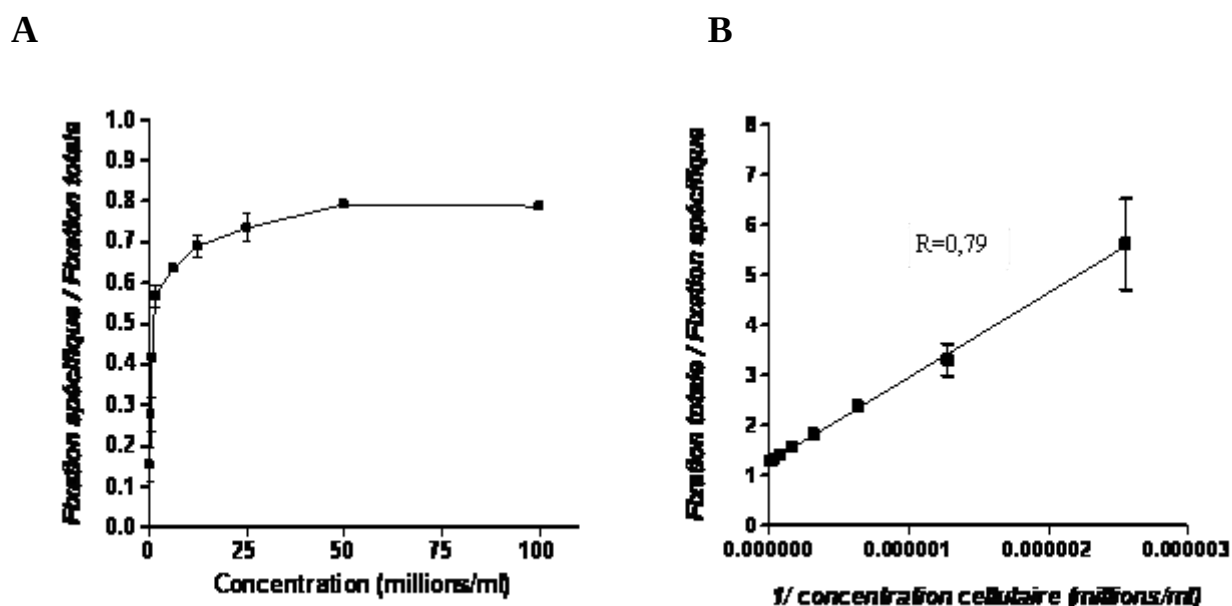


Figure 15. Détermination de la fraction immunoréactive de l'anticorps B-B4 radiomarqué à l' ^{125}I à partir d'une concentration constante du radioimmunoconjugué sur une gamme de concentration de la lignée U266 de myélome multiple humain exprimant le CD138. Le test a été réalisé sur une gamme de 9 dilutions au $\frac{1}{2}$ de la lignée cellulaire (à partir d'une concentration initiale de 100 millions de cellules/ml à 0,39 millions/ml). La concentration finale dans le milieu réactionnel de l'anticorps B-B4 radiomarqué est de $5,1 \times 10^{-10}$ M. **A** rapport de la fixation spécifique sur la fixation totale en fonction de la concentration cellulaire (exprimée en millions/ml). **B.** Inverse du graphique précédent permettant la détermination de la fraction immunoréactive. Le facteur R représente l'inverse de l'ordonnée à l'origine, qui correspond à la fraction immunoréactive de l'anticorps B-B4 radiomarqué à l' ^{125}I , selon la méthode de Lindmo (Lindmo, Boven et al. 1984).

Le test d'immunoréactivité confirme que le marquage de l'anticorps à l' ^{125}I perturbe peu le site de liaison à l'antigène, sur cellules trypsinées. Cette technique peut donc être appliquée au marquage de l'anticorps à l' ^{131}I , pour les essais pré-cliniques. Par ailleurs, le test de fixation à l'équilibre révèle une expression faible du CD138 par les cellules MDA-MB-468 en culture. Rappelons que la mise en suspension des cellules par la trypsine peut modifier le nombre d'antigènes de surface par clivage protéolytique. C'est pourquoi nous avons voulu évaluer par immunohistochimie l'expression de cet antigène sur des coupes de tumeur MDA-MB-468 établies chez la souris *nude*.

III. Immunohistochimie du B-B4 sur coupes de carcinome mammaire

L'étude immunohistochimique a été réalisée sur une coupe de tumeur, prélevée sur souris *nude* préalablement greffée avec la lignée MDA-MB-468. La figure 16 représente deux immunomarquages. Le premier (A) correspond à la coloration de la lignée cellulaire, le

second (B) correspond à l'immunomarquage du tissu par l'anticorps B-B4. On peut observer tout d'abord les trabécules du tissu mammaire associées à un important polymorphisme nucléaire, une forte activité mitotique ainsi qu'un aspect de nécrose (central). Malgré le faible niveau d'expression du CD138 sur les cellules MDA-MB-468 *in vitro*, l'immunomarquage réalisé à l'aide de l'anticorps B-B4 permet de révéler la présence du CD138 au niveau membranaire. C'est pourquoi cette lignée a donc été retenue pour les études qui suivent, chez l'animal. Ce test nous a permis également de constater l'absence d'expression des récepteurs aux oestrogènes et à la progestérone (données non montrées). Cette lignée cellulaire peut donc se développer sans traitement hormonal concomitant, ce qui présente un intérêt non négligeable par rapport à de nombreuses autres tumeurs dites hormono-dépendantes greffées chez la souris *nude*. Ceci constitue un avantage pour l'expérimentation animale puisque la croissance de la tumeur est indépendante d'un traitement hormonal substitutif. Cet aspect est intéressant également d'un point de vue clinique, où le ciblage du syndecan-1 en RIT peu être envisagé comme un traitement alternatif aux traitements hormonaux, pour les tumeurs n'exprimant pas les récepteurs aux oestrogènes.

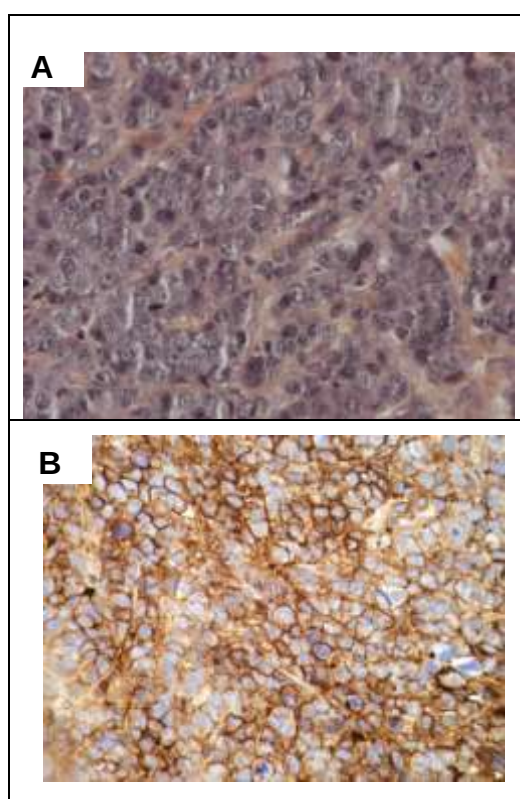


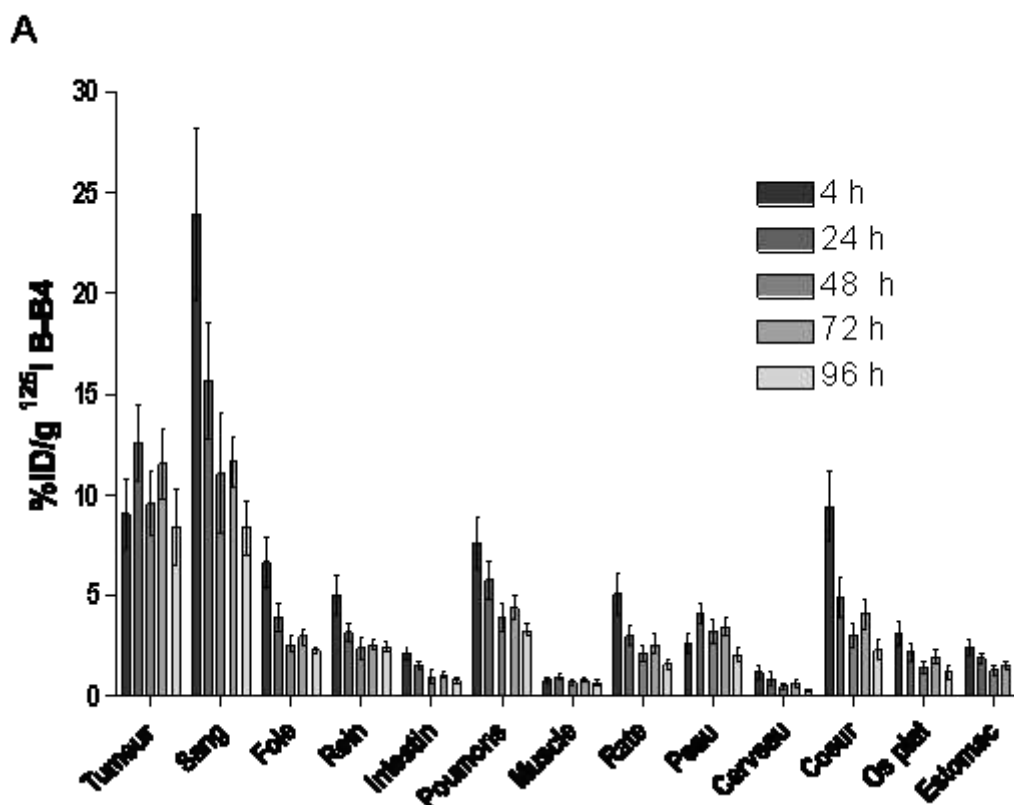
Figure 16. Etude immunohistochimique du B-B4 sur coupes de tumeurs MDA-MB-468. **A.** Simple coloration tissulaire à l'hématoxyline-éosine. **B.** Immunomarquage du CD138 avec coloration à l'hématoxyline-éosine (grossissement x400).

Après avoir validé la pertinence du modèle, nous avons étudié la biodistribution de l'anticorps B-B4, au sein des différents organes de la souris, afin d'évaluer l'intérêt du ciblage du syndecan-1 sur ce type de tumeur.

IV. Etude de biodistribution de l'anticorps B-B4 radiomarqué à l' ^{125}I

L'étude de biodistribution de l'anticorps B-B4 marqué à l' ^{125}I nous a permis d'évaluer la cinétique de distribution et l'accumulation au niveau de la tumeur. Le test a été réalisé sur souris *nude* greffées avec 5×10^6 de cellules MDA-MB-468, 25 jours avant l'injection du radioimmunoconjugué. L'anticorps B-B4 a été radiomarqué avec l' ^{125}I , avec un rendement de marquage supérieure à 98% et une activité spécifique de 185 kBq/ μg (5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) d'anticorps. Le taux de fixation est exprimé en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissus (%ID/g).

La fixation maximale de l'anticorps B-B4 couplé à l' ^{125}I est obtenue 24h après l'injection du radioimmunoconjugué ($12,55 \pm 3,7$ %ID/g). Ce taux de fixation est maintenu jusqu'à la fin de l'étude, avec un pourcentage encore relativement élevé de $8,40 \pm 1,9$ à 96h (Figure 18). L'accumulation maximale au niveau des organes sains est obtenue à 4h, mais décroît très rapidement avec une cinétique similaire à celle du sang (Figure 18). Les plus fortes fixations sont observées à 4h, pour les organes sains les plus vascularisés comme le cœur ($9,42 \pm 3,38$ %ID/g), les poumons ($7,56 \pm 2,36$ %ID/g), ou le foie ($6,63 \pm 2,31$ %ID/g) pour lequel un tropisme particulier a été mis en évidence au cours de l'essai clinique de phase I/II de RIT β de myélome multiple. Le niveau de fixation de l'anticorps B-B4 au niveau du sang, constant entre 24h et 96h souligne la stabilité du radioimmunoconjugué *in vivo*.



	4h		24h		48h		72h		96h	
	%ID/g	SD	%ID/g	SD	%ID/g	SD	%ID/g	SD	%ID/g	SD
Tumeur	9,83	3,10	13,77	3,12	11,09	0,78	12,62	3,23	8,79	1,98
Sang	26,20	7,09	15,36	4,53	13,37	2,92	12,79	1,97	8,74	1,42
Foie	7,14	2,28	4,23	1,35	2,82	0,41	3,21	0,72	2,36	0,15
Rein	5,51	1,64	3,37	0,70	2,75	0,66	2,75	0,43	2,58	0,28
Intestin	2,24	0,57	1,59	0,32	1,28	0,13	1,18	0,30	0,79	0,13
Poumon	7,80	2,48	6,22	1,64	4,49	0,58	4,86	0,98	3,40	0,32
Muscle	0,80	0,28	1,03	0,24	0,83	0,13	0,89	0,16	0,67	0,15
Rate	5,47	1,84	3,24	0,88	2,28	0,44	2,91	0,82	1,67	0,28
Peau	2,77	0,99	4,27	0,95	3,68	0,44	3,75	0,73	2,13	0,34
Cerveau	1,26	0,61	1,01	0,72	0,39	0,05	0,70	0,30	0,30	0,06
Coeur	10,24	3,06	5,41	1,66	2,73	0,63	4,61	1,29	2,37	0,51
Os	3,32	1,19	2,37	0,74	1,24	0,16	2,14	0,65	1,23	0,38
Estomac	2,29	0,64	2,03	0,36	1,44	0,21	1,66	0,36	1,09	0,23

Figure 17. Etude de la biodistribution de l'anticorps B-B4 marqué à l' ^{125}I , sur des souris *nude* greffées avec 5×10^6 de cellules appartenant à la lignée MDA-MB-468 de cancer du sein humain. La fixation du radioimmunoconjugué est représentée par le pourcentage de la dose initiale injectée par gramme (%ID/g), de chaque organe ou tissu prélevé.

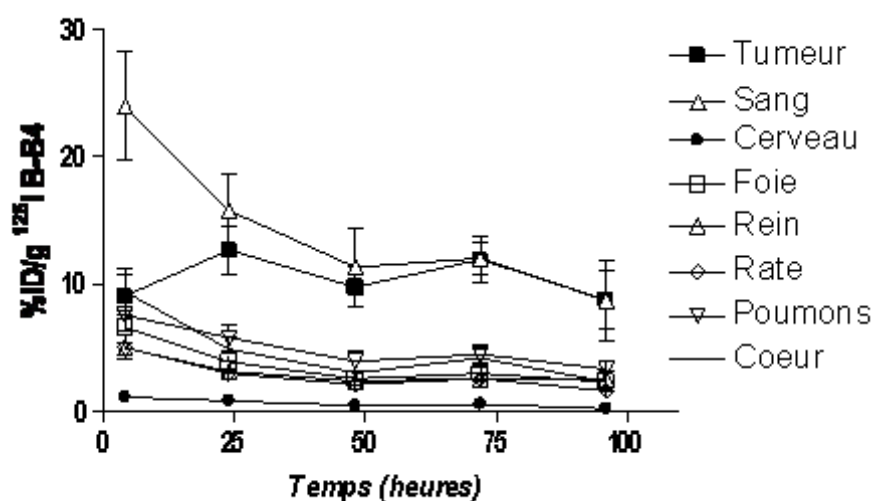
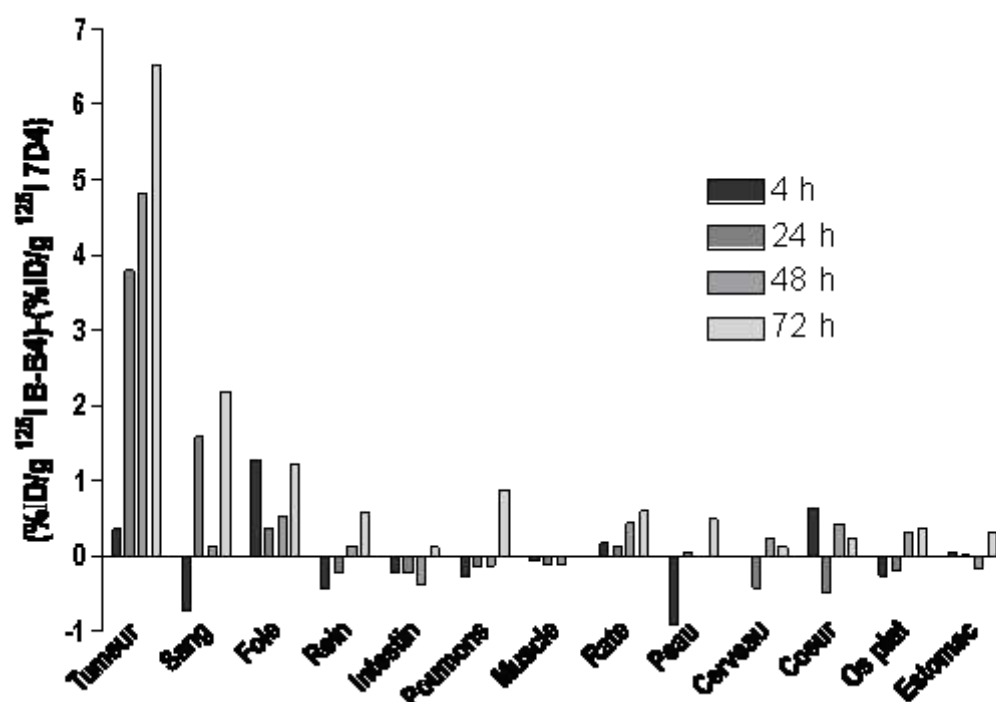


Figure 18. Biodistribution de l'anticorps B-B4 couplé à l' ^{125}I au sein de chaque organe pour chaque point de prélèvement.

Afin de déterminer la fixation spécifique et non spécifique de l'anticorps B-B4, nous avons réalisé une étude de biodistribution de l'anticorps 7D4, ne reconnaissant pas le syndecan-1 et de même isotype que l'anticorps B-B4 (IgG1) (Bernardeau, Gouard et al. 2005). Chaque pourcentage de la dose administrée par gramme (%ID/g) obtenu au cours de la biodistribution de l'anticorps 7D4 est soustrait aux %ID/g mesurés pour l'anticorps B-B4. La valeur obtenue pour chaque organe correspond ainsi à la fixation spécifique de l'anticorps B-B4. Les résultats présentés dans la figure 19 montrent clairement que tous les organes excepté la tumeur, fixent de la même manière l'anticorps spécifique et non spécifique, avec des différences qui n'excèdent pas 1% ID/g. Cette faible marge d'erreur nous indique que la fixation spécifique de l'anticorps B-B4 est uniquement tumorale. Par ailleurs, le point 4h montre qu'il n'y a aucune différence entre la fixation du B-B4 et du 7D4 au niveau tumoral. La fixation devient seulement spécifique au bout de 24h, avec un %ID/g de 3,78. Ce pourcentage augmente jusqu'à 72h, avec une valeur maximale de 6,51 %ID/g.

A



B

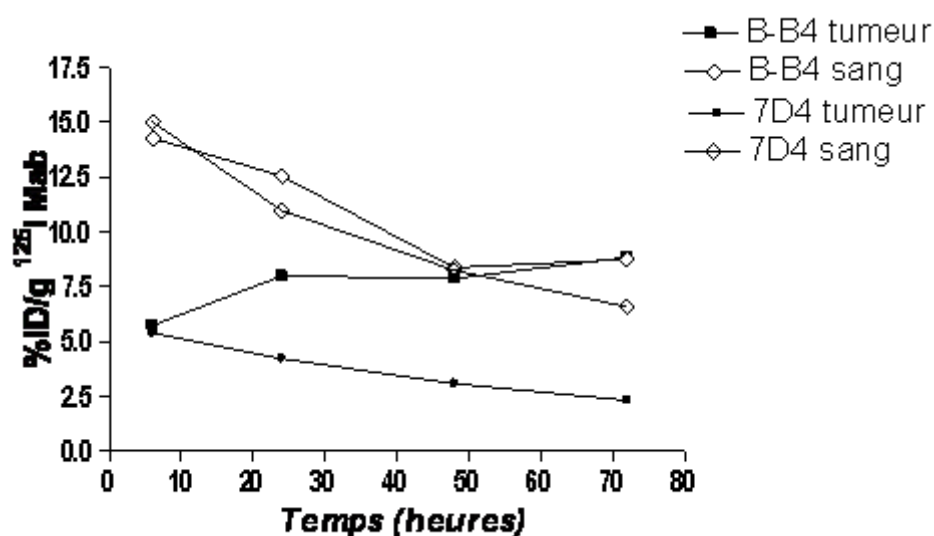


Figure 19. Comparaison de la biodistribution de l'anticorps B-B4 spécifique avec l'anticorps 7D4 non spécifique du syndecan-1. **A.** Représentation de la distribution de l'anticorps B-B4 radiomarqué à l' ^{125}I à laquelle est soustrait celle du 7D4 également radiomarqué avec l' ^{125}I , pour chaque organe prélevé. **B.** Distribution des anticorps B-B4 et 7D4 radiomarqués à l' ^{125}I , au niveau du sang et de la tumeur.

C. Etude de toxicité et évaluation de la dose maximale tolérée (DMT)

I. Etude de la toxicité intrinsèque de l'anticorps B-B4

Nous avons évalué dans un premier temps l'étude de la croissance tumorale après administration de l'anticorps B-B4 non radiomarqué et d'une solution de PBS (1X). Les injections ont été réalisées sur deux lots de souris différents afin de mesurer l'activité intrinsèque de l'anticorps non radiomarqué. Les résultats obtenus montrent que l'anticorps B-B4 non radiomarqué ne possède pas d'activité biologique intrinsèque permettant d'obtenir la destruction de la tumeur. La croissance tumorale est en effet identique dans les deux lots d'animaux testés.

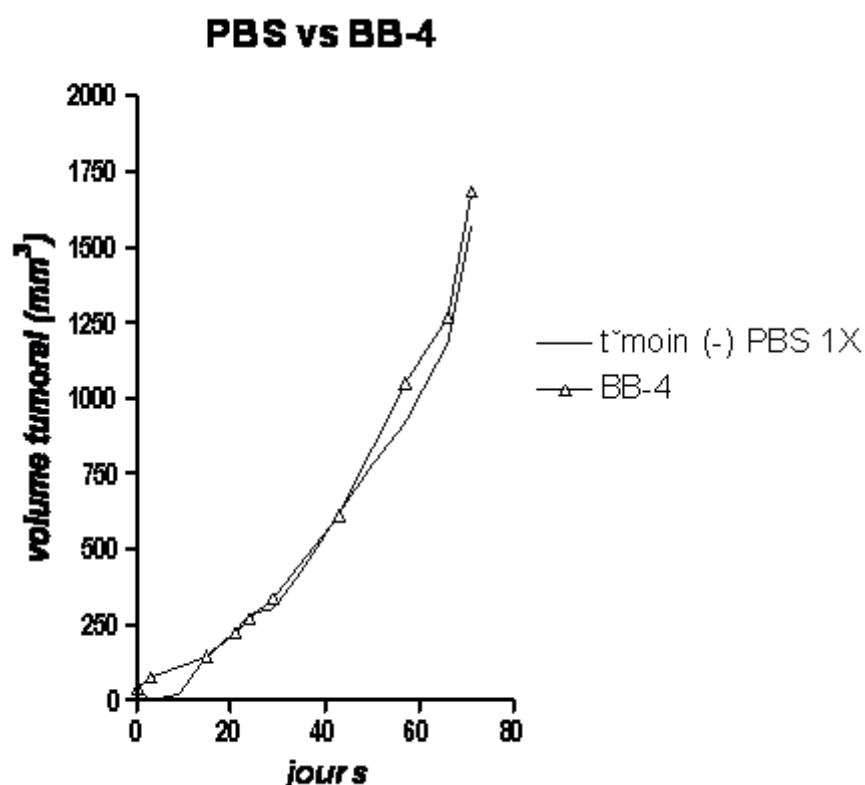


Figure 20. Etude comparative de la croissance tumorale sur des lots de souris ayant reçu d'une part une solution de PBS 1X (n=5), et d'autre part une dose de l'anticorps B-B4 non radiomarqué (n=5).

II. Détermination de la dose maximale tolérée (DMT)

Une escalade de doses de 11,1 MBq à 37 MBq (11,1-14,8-18,5-22,2-25,9-37 MBq soit 300-400-500-600-700 μ Ci et 1mCi) d' ^{131}I couplé à l'anticorps B-B4 a été testée sur un nombre limité de souris pour pouvoir déterminer la toxicité hématologique ainsi que la dose maximale tolérée. La DMT est définie comme étant la dose ne générant aucune perte de poids supérieure à 10%, ni aucun décès durant les 100 jours de l'étude. Les animaux ayant reçu la dose de 37 MBq (1mCi - n=3) ont présenté une perte de poids supérieure à 10% pour deux d'entre eux. L'ensemble des souris ayant reçu cette dose est décédé trois semaines après le traitement. Cette précision nous indique que la dose de 37 MBq (1mCi) est supérieure à la DMT.

Parmi les sept souris ayant reçu la dose de 25,9 MBq (700 μ Ci), deux d'entre elles ont perdu plus de 10% de leur poids initial (soit 28%), et une seule souris est morte 20 jours après le début du traitement (14%). Ces résultats nous ont permis de fixer la DMT à 22,2 MBq (600 μ Ci), les souris ayant reçu cette dose ne présente aucune perte de poids >10% ni de décès pendant l'essai.

III. Evaluation de la toxicité de la RIT β utilisant l' ^{131}I /B-B4

La toxicité hématologique a été déterminée à partir de la numération des cellules sanguines (plaquettes, leucocytes). Les résultats sont répertoriés dans la figure 21. Le nombre de globules rouges a été également suivi, mais sans variations apparentes.

La concentration moyenne en leucocytes du groupe témoin est de $5,38/\text{mm}^3$ (avec des valeurs minimale de 3,910 et maximale de 6,858), celle des plaquettes s'élève à $1,46 \times 10^6/\text{mm}^3$ (valeur minimale de 1,30 et maximale de $1,62 \times 10^6$). La toxicité relative au taux plaquettaire et leucocytaire est comparée au groupe témoin. Le pourcentage de variation est exprimé entre le taux enregistré à J14 (*nadir*) et le taux mesuré à J0, pris comme valeur de référence. Ainsi, la toxicité relative au niveau plaquettaire comparée au groupe témoin est de $-30 \pm 5\%$ pour les groupes ayant reçu les activités 11,1-14,8 et 18,5 MBq ($p=0,05$), $-56 \pm 15\%$ pour les groupes ayant reçu la DMT et 25,9 MBq ($p=0,003$) et $-84 \pm 3\%$ pour les groupes ayant reçu la plus forte activité (37 MBq) ($p=0,0001$). La toxicité relative au taux leucocytaire comparée au groupe témoin est de $-43 \pm 40\%$ pour le groupe ayant reçu l'activité 11,1 MBq (p non renseigné), $-80 \pm 11\%$ pour le groupe ayant reçu 14,8-18,5 et 22,2 MBq ($p=$

0,02), $-90 \pm 8\%$ pour le groupe ayant reçu 25,9 MBq ($p = 0,001$) et $-99 \pm 0,1\%$ pour le groupe ayant reçu 37 MBq ($p = 0,002$).

Le nombre de leucocytes et de plaquettes est rapidement et spontanément restaurés excepté pour le groupe d'animaux ayant reçu l'activité 37 MBq, groupe dans lequel aucune souris n'a survécu 2 semaines après le début du traitement. Les décès répertoriés au niveau des groupes ayant reçu les activités 37 MBq et 25,9 MBq peuvent être associés à la toxicité relative aux fortes activités de RIT (leucopénie et thrombopénie).

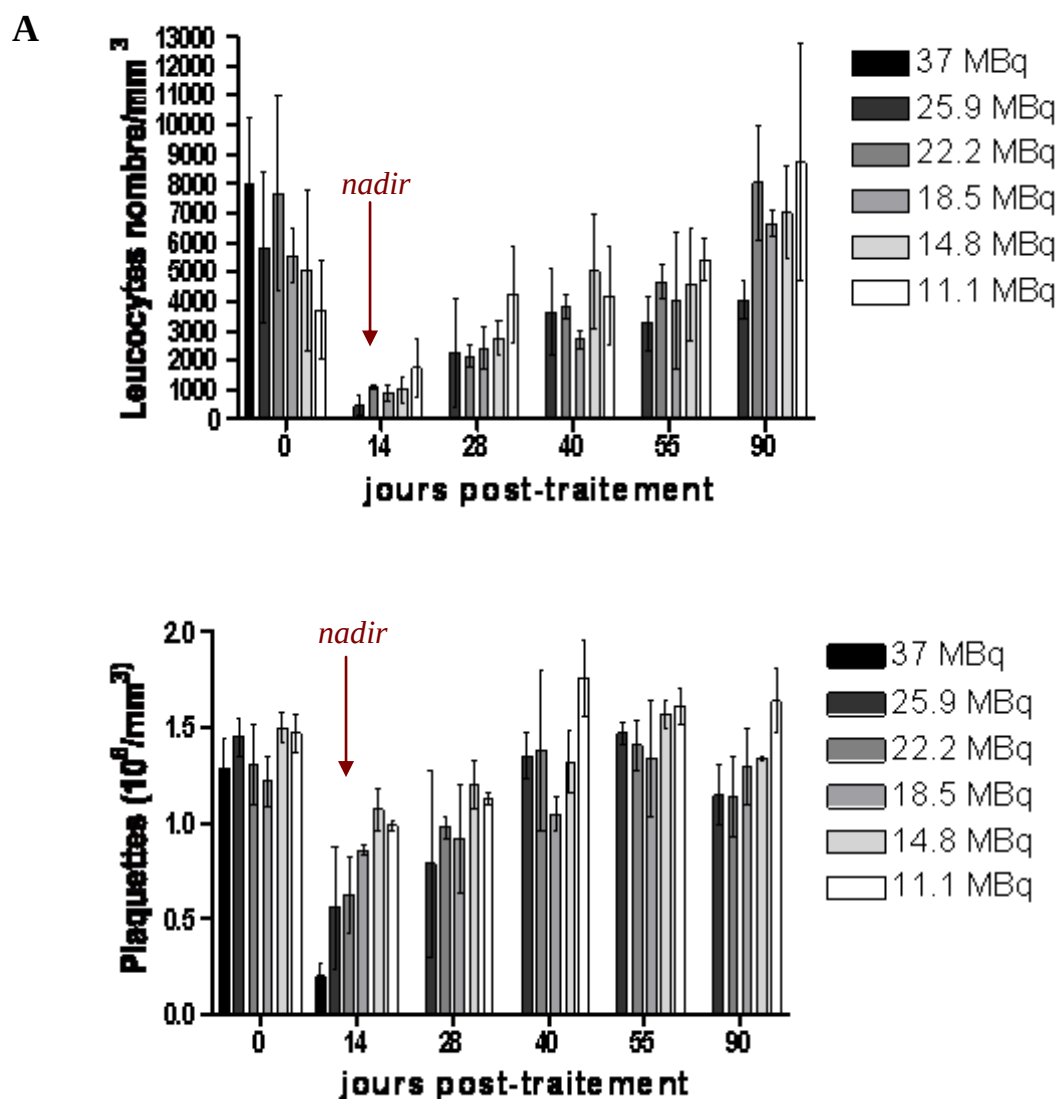


Figure 21. Etude de la toxicité hématologique de l'anticorps B-B4 couplé à ^{131}I . Les prélèvements ont été réalisés à l'œil et recueillis à J0, J14, J28, J40, J55 et J90. Le nombre de cellules sanguines a été mesuré à l'aide d'un compteur de cellules (Laboratoires Melet-Scholoesing Cergy-Pontoise-France). **A.** Formule leucocytaire. **B.** Formule plaquettaire. Il est important de noter que les souris ayant reçu l'activité de 37 MBq sont mortes après J14.

D. Etude de la réponse tumorale à l'essai de RIT β utilisant I^{131} I/B-B4

La figure 22 représente les réponses tumorales obtenues dans deux études de RIT β menées de façon indépendante. Ces deux essais ont été réalisés sur deux lots de souris *nude*, préalablement greffées avec la lignée humaine de carcinome mammaire. Ces deux études ont permis d'évaluer l'efficacité des activités fixées à 14,8 MBq (400 μ Ci) et 22,2 MBq (600 μ Ci). La moyenne des volumes tumoraux a été calculée pour chaque groupe, et chaque mesure.

Une réponse tumorale claire est observée dans chacun des groupes traités par rapport au groupe témoin, n'ayant pas été traité. Malgré les variations inter-individuelles des courbes de croissance tumorales au sein du même groupe, les analyses statistiques révèlent une différence très significative du volume tumoral moyen, entre le groupe ayant reçu 22,2 MBq et le témoin ou celui ayant reçu 14,8 MBq ($p < 0,0001$), mais également entre le groupe ayant reçu 14,8 MBq et le lot témoin ($p = 0,028$). Ces résultats confirment la relation existante entre l'activité administrée et l'effet observée (figure 23).

Afin de classer les différentes réponses tumorales observées, nous avons préalablement définis trois stades de réponses thérapeutiques : la disparition totale de la tumeur sans récurrence jusqu'à la fin de l'étude (≥ 96 jours) ; les réponses complètes ou totales (RC) qui correspondent à la disparition de la tumeur pendant au moins 7 jours, mais avec récurrence ensuite ; et enfin les réponses partielles (PR), associées à une diminution du volume tumoral d'au moins 50% pendant 7 jours au minimum, avec récurrence. La dose correspondant à la DMT (22,2 MBq) a permis de soigner totalement 37,5 % des souris (3 sur 8), deux réponses complètes ont été également obtenues, ainsi que trois réponses partielles sur une durée moyenne de 48 ± 32 jours. Concernant le groupe ayant reçu 14,8 MBq d' I^{131} I, 37,5 % des animaux traités ont répondu partiellement au traitement sur une durée moyenne de 31 ± 5 jours.

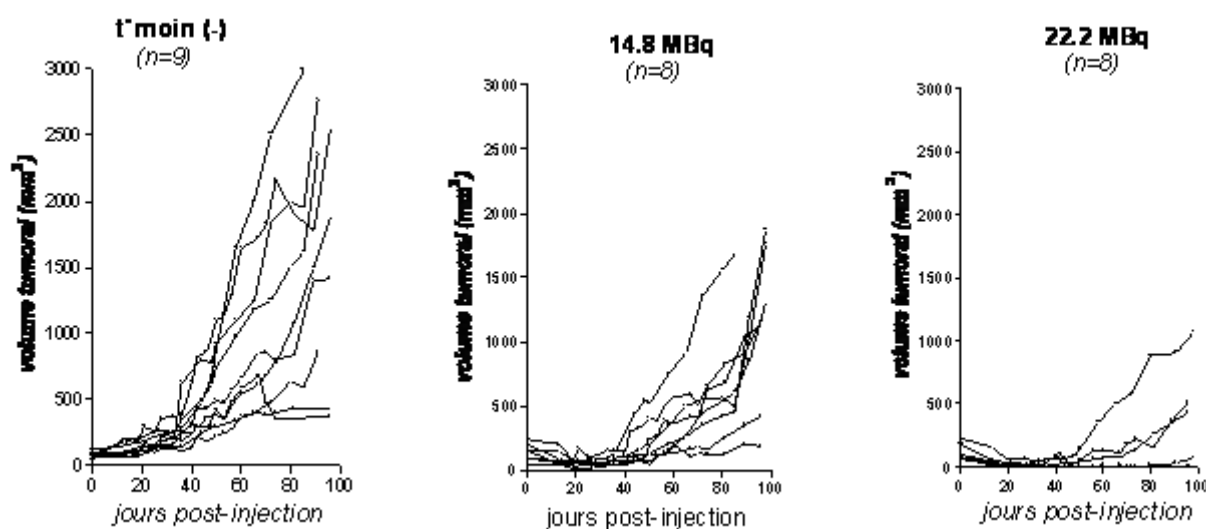


Figure 22. Evaluation de la réponse tumorale dans un essai de RIT β , utilisant comme émetteur β , ^{131}I , couplé au B-B4 spécifique du syndecan-1. Deux activités sont étudiées, 14,8 MBq (400 μCi -n=8) et 22,2 MBq (600 μCi -n=8) et comparées au groupe témoin ayant reçu l'anticorps non radiomarqué (n=9).

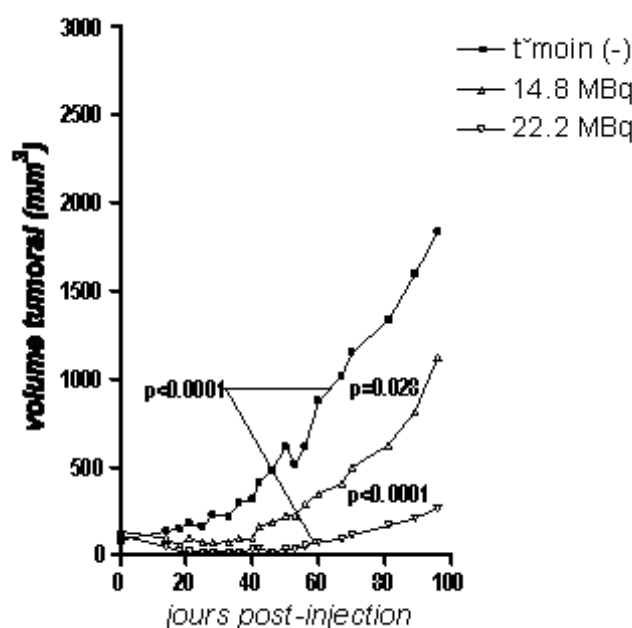


Figure 23. Etude comparative des volumes tumoraux moyens des différents groupes traités (14,8 MBq soit 400 μCi et 22,2 MBq soit 600 μCi) et du témoin négatif. Les différences entre chaque groupe sont significativement différentes.

Nous avons ensuite étudié les réponses tumorales au traitement en évaluant le retard de croissance, c'est-à-dire le temps requis pour que la tumeur double son volume initial. Cette étude a été réalisée à partir des croissances tumorales obtenues au cours de l'essai de RIT β (figure 24).

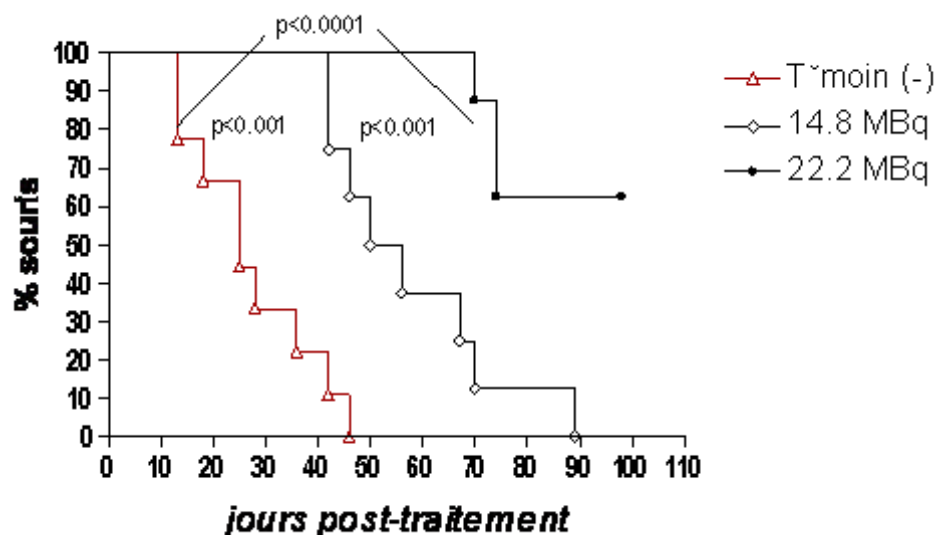


Figure 24. Etude du temps de doublement des tumeurs traitées en RIT β avec l'anticorps B-B4 couplé à l' ^{131}I administrées aux activités suivantes : 14,8 MBq (400 μCi) et 22,2 MBq (600 μCi). Une analyse statistique a permis d'évaluer les différences entre chaque groupe.

Les différences obtenues entre les résultats de chaque groupe étudiés sont significatives. L'efficacité du traitement dépendant de l'activité administrée d' ^{131}I est confirmée par cette étude. Le retard de croissance tumoral moyen est de 28 ± 13 et 58 ± 17 jours pour le groupe témoin et celui ayant reçu 14,8 MBq, respectivement. Par ailleurs, parmi les 8 souris traitées avec l'activité 22,2 MBq, seulement trois d'entre elles possèdent un volume tumoral plus important que leur volume initial (à J0), à la fin de l'étude. L'activité correspondant à la DMT, 22,2 MBq est donc la plus efficace.

Nous avons prouvé l'efficacité du ciblage du syndecan-1 couplé à l' ^{131}I dans un modèle de carcinome mammaire humain. Le stade tumoral initial mime le stade de tumeur solide chez la souris, mais on peut également considérer que la taille des tumeurs traitées au cours de cette étude, puisse correspondre à un stade de micrométastases ou de maladie résiduelle chez l'homme. Nous disposons de ^{213}Bi au sein du laboratoire, de façon régulière, avec lequel des études *in vitro* ont déjà été réalisées au sein de notre équipe (Supiot, Faivre-

Chauvet et al. 2002). Par ailleurs, les paramètres de biodistribution de l'anticorps B-B4 ayant été déterminés, il était donc intéressant d'étudier le potentiel thérapeutique de l'anticorps B-B4 couplé au ^{213}Bi , dans ce modèle de carcinome mammaire.

Résultats – Partie II :

RIT α du cancer du sein

L'objectif de cette étude est d'évaluer le potentiel thérapeutique des particules α dans un modèle de carcinome mammaire mimant le stade de la maladie résiduelle. Elle va ainsi nous permettre de comparer l'efficacité des rayonnements β , démontrée dans le chapitre précédent, avec celle des rayonnements α sur un même modèle de carcinome. Nous allons également déterminer les fenêtres de doses utilisables en RIT alpha sur ce modèle murin de carcinome mammaire.

A. Ciblage du syndecan-1 en RIT α utilisant le ^{213}Bi

I. Radiomarquage du B-B4 au ^{213}Bi

1. Couplage de l'anticorps au CHX-A''-DTPA

Contrairement aux atomes d'iode qui peuvent se fixer directement sur les noyaux aromatiques activés des tyrosines des anticorps, la fixation des atomes de ^{213}Bi et d'une façon générale, des éléments métalliques, nécessite l'utilisation d'une cage moléculaire ou chélate. Dans ce cadre, le chélate bifonctionnel utilisé pour être couplé à l'anticorps spécifique du syndecan-1 est l'acide trans-cyclohexylenetriamine pentaacétique (CHX-A''-DTPA). L'atome métallique est chélaté avec les atomes d'azote et d'oxygène et forme un complexe stable empêchant le relargage de l'atome de ^{213}Bi . Le chélate est couplé par son groupement isothiocyanate ($\text{N}=\text{C}=\text{S}$) sur les fonctions amines (NH_2) de l'anticorps monoclonal.

Afin de déterminer le nombre d'agents complexant fixés par molécule de vecteur, un test de couplage à l'indium est réalisé. L'indium réagissant mole à mole avec l'agent complexant, une solution de molarité connue en indium est additionnée de traces radioactives d'indium radioactif, l' ^{111}In . Cette solution traçante nous permet, via la stoechiométrie de la réaction, de déterminer le nombre moyen de ligands par anticorps. Le rendement de marquage est obtenu par chromatographie (sur couche mince de silice), en évaluant le pourcentage d'indium marqué à l'anticorps par rapport à l'indium libre (le seul ayant migré par chromatographie). Ce pourcentage permet de calculer un nombre de ligands susceptibles d'être fixé par anticorps. Dans le cadre de notre étude nous avons obtenu des rendements de marquage situés entre 60 et 80%, correspondant à 2 ou 3 ligands fixés par molécule d'anticorps sachant que nous avons utilisé 4 équivalent de la solution d'indium (cf. Matériels et méthodes).

2. Immunoréactivité de l'anticorps couplé au CHX-A''-DTPA

La fixation des agents chélatants sur l'anticorps peut dans certains cas modifier son affinité pour la cible. Nous avons donc évalué l'immunoréactivité de l'anticorps B-B4 couplé au CHX-A''-DTPA par un marquage réalisé par cytométrie en flux sur la lignée MDA-MB-468. La fixation a été révélée par une gamme de concentration de l'anticorps B-B4 et couplé au CHX-A''-DTPA (figure 25).

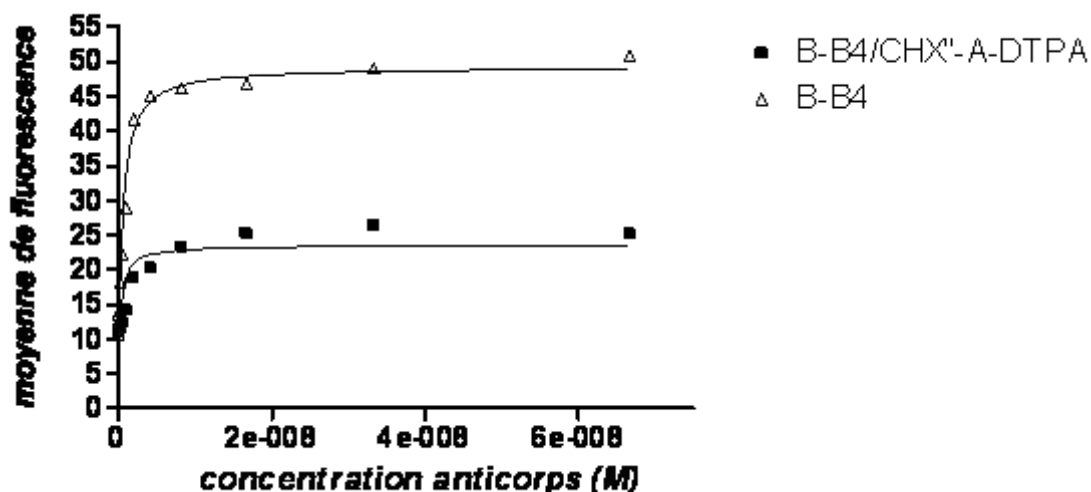


Figure 25. Immunoréactivité de l'anticorps B-B4 couplé au CHX-A''-DTPA sur la lignée humaine de carcinome mammaire MDA-MB-468.

Un modèle de régression non linéaire de type "one binding site" nous a permis de comparer les affinités apparentes de chaque anticorps dans ce test. Bien que la cytométrie ne constitue pas en soit une technique de mesure de fixation de l'anticorps, les résultats peuvent être parfaitement représentés par un modèle de régression non linéaire de type "one binding site". Ce type de régression permet d'accéder seulement à une valeur apparente de l'affinité, elle permet toutefois de comparer un même anticorps sous sa forme native modifiée.

Les constantes de dissociation (K_d) apparentes sont du même ordre, $2,61 \cdot 10^{-10}$ M pour l'anticorps couplé au CHX-A''-DTPA et $4,78 \cdot 10^{-10}$ M pour l'anticorps B-B4 non couplé. Les différences observées sont faibles et proportionnelles à l'ordre de grandeur des incertitudes sur la mesure des concentrations d'anticorps. Le test simple et rapide permet d'évaluer l'impact global du marquage de l'anticorps sur l'immunoréactivité. Alors que les constantes d'affinité apparentes sont du même ordre, les niveaux de fixation maximale de l'anticorps natif ou couplé diffèrent fortement. L'utilisation d'un anticorps secondaire polyclonal couplé à la

fluorescéine (FITC) pour la révélation du test peut rendre compte de ces différences puisque la modification de l'anticorps par le chélate peut modifier certains épitopes reconnus par une partie des anticorps secondaires polyclonaux fluorescents. Afin d'améliorer ces résultats il serait possible de mesurer l'immunoréactivité de l'anticorps couplé au CHX-A"-DTPA, par un test de Lindmo en marquant l'anticorps couplé à l' ^{111}In . Ce test ne peut pas être réalisé après marquage des anticorps par le ^{213}Bi , compte tenu de sa courte demi-vie (45,6 min).

3. Marquage de l'anticorps B-B4 couplé au ^{213}Bi

Le ^{213}Bi , est élué à partir d'un générateur d' ^{225}Ac . Les générateurs d' ^{225}Ac que nous utilisons dans nos expériences sont fournis par l'institut des Transuraniens de Karlsruhe (ITU, Allemagne). Ils permettent d'obtenir du ^{213}Bi sous forme d'iodure de bismuth ($\text{BiI}_3/\text{BiI}_4^-$) utilisable en RIT alpha. Ils peuvent être utilisés environ 3 semaines après réception en fonction de leur chargement. Au-delà, les activités volumiques sont trop faibles pour permettre l'injection d'une dose efficace aux souris.

Après élution de ^{213}Bi de la colonne d' ^{225}Ac , l'anticorps B-B4 couplé préalablement au CHX-A"-DTPA est incubé avec la solution contenant le ^{213}Bi . L'anticorps ainsi marqué va pouvoir être utilisé pour le ciblage des cellules. Après élution du ^{213}Bi de la colonne d' ^{225}Ac , l'anticorps B-B4 couplé au CHX-A"-DTPA est incubé avec la solution contenant le ^{213}Bi . L'anticorps radiomarqué est ensuite purifié sur une colonne PD10 puis filtré sur 0,22 μm . Ainsi marqué, il peut être utilisé pour le ciblage des cellules MDA-MB-468. Les différents marquages de l'anticorps B-B4 ont permis d'obtenir des anticorps marqués au ^{213}Bi dans un temps moyen de 30 minutes, avec une pureté radiochimique de 99% en moyenne compatible avec une utilisation en pré-clinique.

Il est important de noter que les activités spécifiques obtenues sont dépendantes de la masse d'anticorps engagée, mais aussi de l'activité du ^{213}Bi éluee. La quantité de ^{213}Bi constitue le facteur limitant de nos essais. Il va conditionner l'activité spécifique du radioimmunoconjugué mais aussi le volume que nous injectons aux animaux pour une dose préalablement définie. L'équilibre séculaire du générateur d'actinium est atteint deux heures après élution. Nous sommes ainsi en mesure d'effectuer jusqu'à six éluions par jour. Chaque élution, en fonction de la dose étudiée permet l'injection de 3 à 9 souris. Les lots de souris, sont donc fréquemment injectés à partir de plusieurs éluions successives. Pour une élution donnée, les volumes sont ajustés en fonction du temps pour compenser la décroissance du

radioélément. Nous travaillons donc à dose constante pour un lot de souris donné avec une variation des quantités d'anticorps injectées. Dans nos conditions de marquage, les activités spécifiques obtenues atteignent au maximum 1147 MBq/mg (31 mCi/mg). Les volumes administrés varient entre 100 et 400 μ L, ce qui représente 4,5 à 18% du volume sanguin total d'une souris *nude* de 30g. Nous ne devons pas dépasser cette gamme volumique pour ne pas créer de désordres physiologiques chez l'animal.

II. Evaluation de la toxicité du ^{213}Bi

1. Détermination de la dose toxique du B-B4/ ^{213}Bi

Cet essai visant à déterminer la dose toxique du radioimmunoconjugué B-B4 couplé au ^{213}Bi a été réalisé chez la souris *nude* préalablement greffée par 5×10^6 cellules appartenant à la lignée MDA-MB-468. Une escalade de doses a été testée. Les activités testées ont été les suivantes: 0 (n=7) ; 3,7 MBq (100 μ Ci) (n=4) ; 7,4 MBq (200 μ Ci) (n=4) ; 9,25 MBq (250 μ Ci) (n=4) ; 11,1 MBq (300 μ Ci) (n=4) ; 12,95 MBq (350 μ Ci) (n=4), et 18,5 MBq (500 μ Ci) (n=5). Chaque activité a été injecté dans les mêmes conditions par voie intraveineuse, au niveau de la veine caudale, 25 jours après la greffe des cellules tumorales. Afin d'évaluer de façon pertinente les réponses au traitement, nous avons défini au préalable, deux paramètres : la dose maximale tolérée (DMT) pour laquelle aucune perte de poids > 10% n'est observée durant l'étude, ni aucun décès jusqu'à la fin de l'étude ; la dose létale 50 (DL50), responsable de 50% de mortalité dans le lot de souris traitées.

Le suivi des plus fortes activités, 12,95 et 18,5 MBq a été limité par la toxicité excessive du traitement. L'étude de la réponse tumorale du groupe ayant reçu 18,5 MBq n'a pas excédé 10 jours, compte tenu de la mort de 60% des animaux traités (3 souris sur 5), 7 jours seulement après l'injection du radioimmunoconjugué, avec une perte de poids supérieure à 10% pour les souris restantes. Cette activité est donc supérieure à la DMT et la DL50. Par ailleurs, nous avons constaté 50% (2 souris sur 4) de mortalité 11 jours après le début du traitement, dans le groupe traité avec 12,95 MBq de ^{213}Bi . Cette activité a donc été définie comme la DL50. Aucun décès n'a été répertorié durant l'étude au sein du groupe ayant reçu l'activité 11,1 MBq, ni aucune perte de poids > 10%. Cette activité constitue donc la MTD. La détermination de ces doses toxiques est rapportée à la durée de notre étude, c'est-

à-dire 75 jours. Ces doses devront être confirmées dans une étude similaire avec un suivi plus long des animaux traités.

dose administrée	effectif du lot	mortalité		nombre souris avec perte pondérale > 10%
		%	jours	
0-témoin (-)	7	/	/	0
3,7 MBq	4	/	/	0
7,4 MBq	4	/	/	0
9,25 MBq	5	/	/	0
11,1 MBq	4	/	/	0
12,95 MBq	4	50	11	2
18,5 MBq	5	60	7	0

Tableau 6. Bilan du pourcentage de mortalité et de la perte pondérale pour chaque dose administrée du radioimmunoconjugué formé par l'anticorps B-B4 couplé au ^{213}Bi , permettant de déterminer la dose maximale tolérée (DMT) et la dose létale 50 (DL50).

2. Evaluation de la toxicité hématologique du B-B4 couplé au ^{213}Bi

Un bilan hématologique a également été réalisé au cours de cet essai pré-clinique. à l'aide de l'anticorps B-B4 couplé au ^{213}Bi (figure 26). L'atteinte au niveau des cellules sanguines a été suivie en effectuant une numération leucocytaire, plaquettaire et érythrocytaire, sur un prélèvement réalisé à l'œil, toutes les semaines. Ce bilan a été réalisé sur les souris ayant reçu les activités suivantes : 9,25 MBq et 12,95 MBq. La toxicité hématologique observée après administration du radioimmunoconjugué est > 90% pour la lignée leucocytaire et > 80 % pour la lignée plaquettaire. L'atteinte de ces deux lignées est constatée une semaine après l'administration du radioimmunoconjugué, quelque soit la dose administrée. La lignée érythrocytaire est également touchée avec une chute observée une semaine après l'injection du B-B4/ ^{213}Bi , elle est plus tardive, (deux semaines après le début du traitement) et proportionnelle à l'activité administrée, avec une chute plus marquée à 12,95 MBq de 21%.

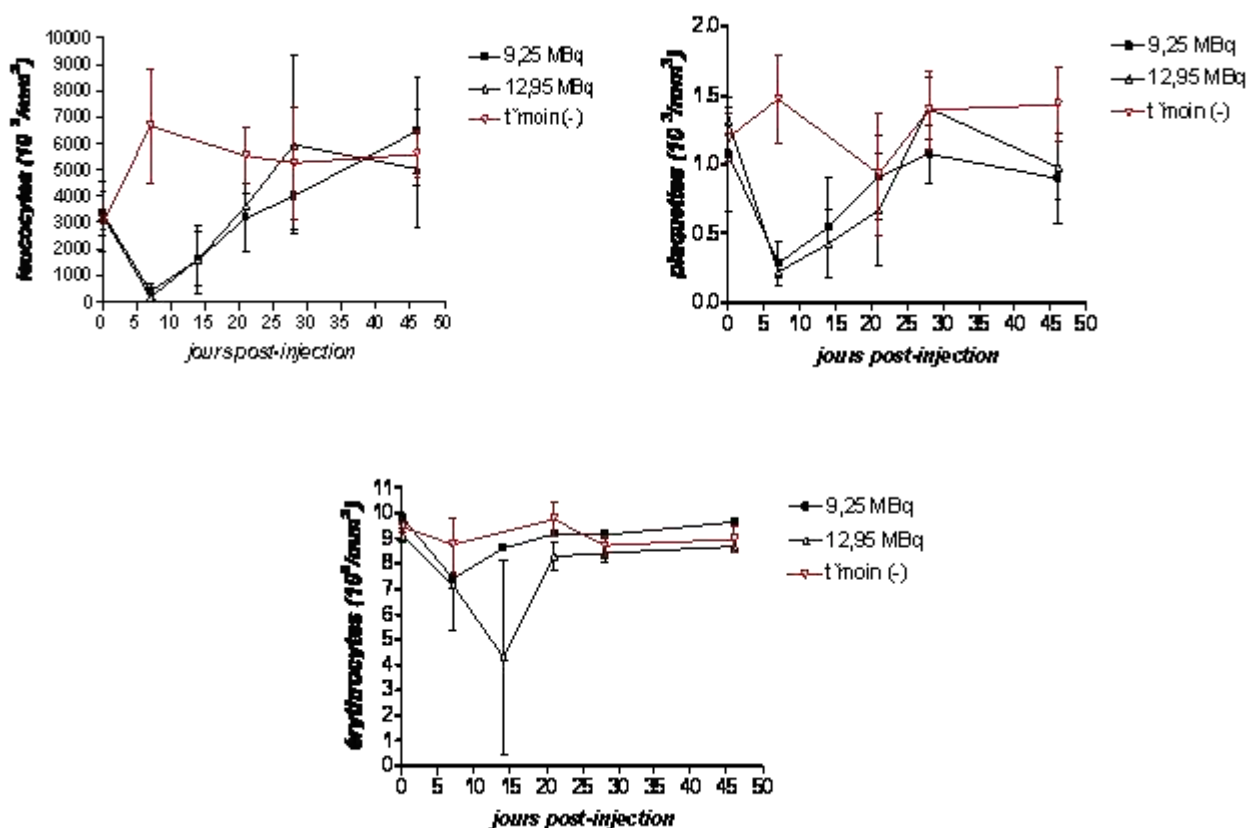


Figure 26. Bilan hématologique en réponse à l'anticorps B-B4 couplé au ^{213}Bi administré aux activités suivantes : 9,25 MBq (250 μCi) et 12,95 MBq (350 μCi). Les lignées plaquettaire, leucocytaire et érythrocytaire ont été suivies sur des prélèvements sanguins de souris traitées avec ce radioimmunoconjugué. Les courbes colorées en rouge indiquent les valeurs du groupe témoin.

III. Evaluation de l'efficacité thérapeutique du B-B4 couplé au ^{213}Bi

1. Etude de la réponse tumorale

Les données nous ayant permis de déterminer la dose toxique et thérapeutique ont été obtenues à partir de différents essais de RIT. Nous avons donc choisi de représenter l'évolution des volumes tumoraux relatifs, par rapport aux volumes tumoraux initiaux, c'est-à-dire mesurés le jour de l'injection du radioimmunoconjugué. Une efficacité dépendante de l'activité administrée est constatée si l'on compare chaque lot traité avec le groupe de souris témoin.

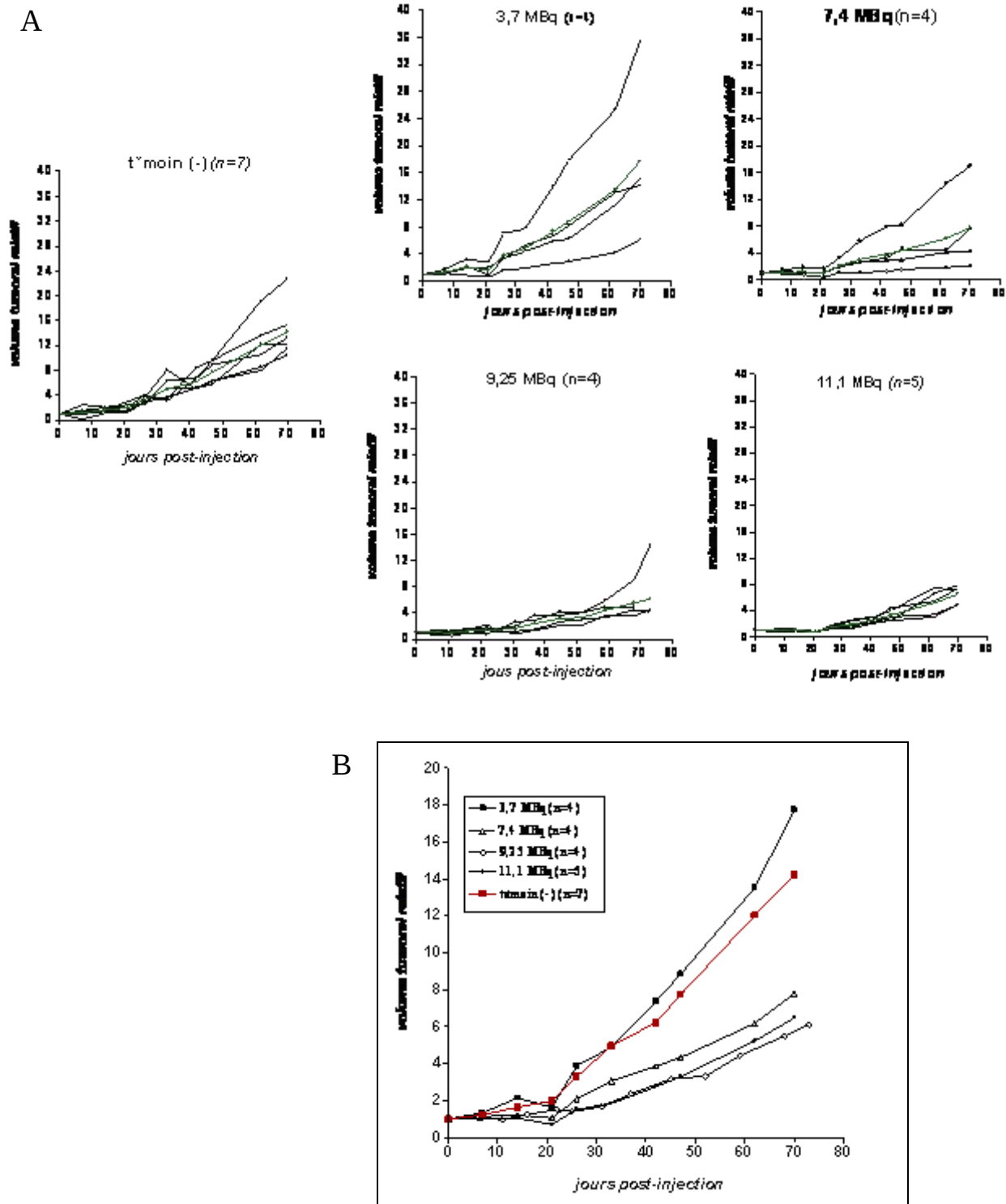


Figure 27. Etude de la réponse tumorale à l'anticorps B-B4 couplé au ^{213}Bi . L'évolution du volume tumoral a été mesurée chaque semaine. Le suivi a été réalisé sur 75 jours. Le groupe témoin correspond au lot de souris n'ayant pas été traité. **A.** Etude de la réponse tumorale pour chacune des activités administrées : 3,7 MBq (100 μCi -n=4), 7,4 MBq (200 μCi -n=4), 8,51 MBq (300 μCi -n=5), 9,25 MBq (250 μCi -n=4) et 11,1 MBq (300 μCi -n=4). Les volumes tumoraux relatifs au volume tumoral initial sont représentés. La courbe surlignée en vert représente la moyenne de chacun des lots traités. **B.** Moyennes des volumes tumoraux relatifs pour chaque activité administrée. La courbe surlignée en rouge représente la moyenne du groupe témoin.

Une régression du volume tumoral est obtenue après administration de 11,1 MBq (300 μ Ci) et de 9,25 MBq (250 μ Ci), 15 jours après l'injection du radioimmunoconjugué, cependant une reprise de la croissance tumorale est rapidement observée, 20 jours après le début du traitement, pour l'ensemble des animaux traités. La plus faible dose (3,7 MBq soit 100 μ Ci) ne semble pas avoir d'effet sur la croissance tumorale. La courbe d'évolution du volume tumoral du groupe traité à 3,7 MBq suit celle du groupe témoin.

Nous avons démontré dans le chapitre évaluant le potentiel thérapeutique de la RIT β , que l'effet observé après administration de l'anticorps B-B4 couplé à l' ^{131}I , était indépendant de l'activité biologique de l'anticorps (figure 20). De plus, selon notre étude de biodistribution (figure 17), l'anticorps B-B4 se fixe spécifiquement au niveau tumoral seulement 24h après l'injection du radioimmunoconjugué, alors que le ^{213}Bi a déjà perdu plus de 95% de son activité au bout de 4h (5 périodes écoulées, soit 1/32 de la dose restante). Ces résultats de biodistribution posent la question de la part relative du ciblage spécifique et non spécifique des cellules MDA-MB-468 dans la réponse tumorale globale. L'effet observé après administration de l'anticorps B-B4 couplé au ^{213}Bi pourrait donc être indépendant de la spécificité de l'anticorps. Afin d'évaluer l'efficacité du ciblage du syndecan-1 en RIT α par l'anticorps B-B4 couplé au ^{213}Bi , nous avons cherché à évaluer le potentiel toxique d'un anticorps ne reconnaissant pas le syndecan-1, et nous permettant de vérifier la spécificité du ciblage. Nous avons choisi l'anticorps OKT3, spécifique de la chaîne gamma du CD3 humain.

2. Ciblage spécifique et non spécifique en RIT α

a. Etude de la toxicité hématologique non spécifique

L'atteinte au niveau des cellules sanguines du radioimmunoconugué OKT3/ ^{213}Bi a été suivie en effectuant une numération leucocytaire, plaquettaire et érythrocytaire, dans les mêmes conditions que l'étude de toxicité hématologique de l'anticorps B-B4 couplé au ^{213}Bi . Ce bilan a été réalisé sur les souris ayant reçu les activités suivantes : 3,7 MBq (100 μ Ci), 7,4 MBq (200 μ Ci), 11,1 MBq (300 μ Ci). La toxicité hématologique observée après administration du radioimmunoconjugué OKT3/ ^{213}Bi est du même ordre que celle observée après administration de l'anticorps B-B4 couplé au ^{213}Bi . En effet, une perte > 90% pour les

lignées leucocytaire et $> 70\%$ pour la lignée plaquettaire est observée dans les deux cas et aux plus fortes activités administrées. La lignée érythrocytaire est également touchée avec une chute plus tardive deux semaines après le début de l'essai, avec une perte de 14% pour la dose de 11,1 MBq.

La toxicité hématologique est indépendante de la spécificité de l'anticorps, et semble uniquement associée à l'effet des rayonnements ionisants. La chute brutale des leucocytes, plaquettes et globules rouges associée à l'apparition de purpura et de pétéchies, souligne une atteinte au niveau vasculaire. Elle reste cependant transitoire. L'aplasie régresse spontanément 3 semaines après l'administration du radioimmunoconjugué. Cela signifie que les cellules souches restent épargnées. Il est important de souligner que l'atteinte de la lignée rouge reste tardive et constatée aux plus fortes activités. En effet, la chute brutale de la lignée rouge est observée 15 jours après l'injection du radioimmunoconjugué. Elle semble être caractéristique des rayonnements alpha. En effet, aucune variation apparente n'a été observée au cours de l'essai de RIT β .

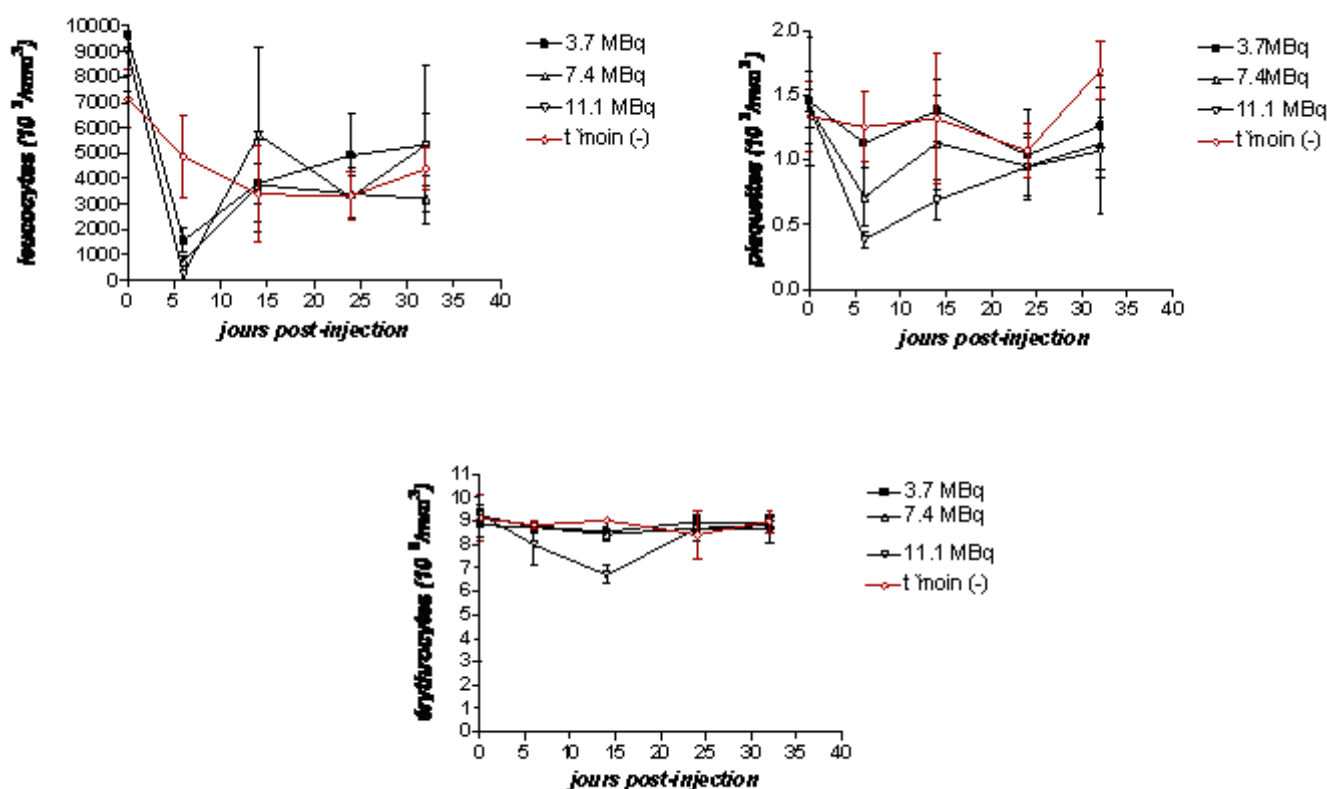


Figure 28. Bilan hématologique de l'anticorps non spécifique du syndecan-1, l'OKT3 couplé au ^{213}Bi et administré aux activités suivantes : 3,7 MBq (100 µCi), 7,4 MBq (200 µCi) et 11,1 MBq (300 µCi).

b. Suivi pondéral

L'évaluation de la perte de poids est un critère important soulignant une toxicité aiguë d'un traitement donné. Nous avons choisi de comparer à doses équivalentes les deux types de radioimmunoconjugués. Aucune perte de poids supérieure à 10 % n'est observée pour la dose de 11,1 MBq, quelque soit l'anticorps. La DMT de l'OKT3 couplé au ^{213}Bi semble donc identique à celle du B-B4 couplé au ^{213}Bi . Néanmoins, il semble que l'OKT3 ait un effet plus toxique que l'anticorps B-B4, sachant que l'ensemble des poids mesurés pour le groupe ayant reçu l'OKT3 se situe sous la courbe moyenne du lot témoin. Cet essai reste à confirmer sur de plus grands effectifs, et sur un suivi effectué sur une plus longue période.

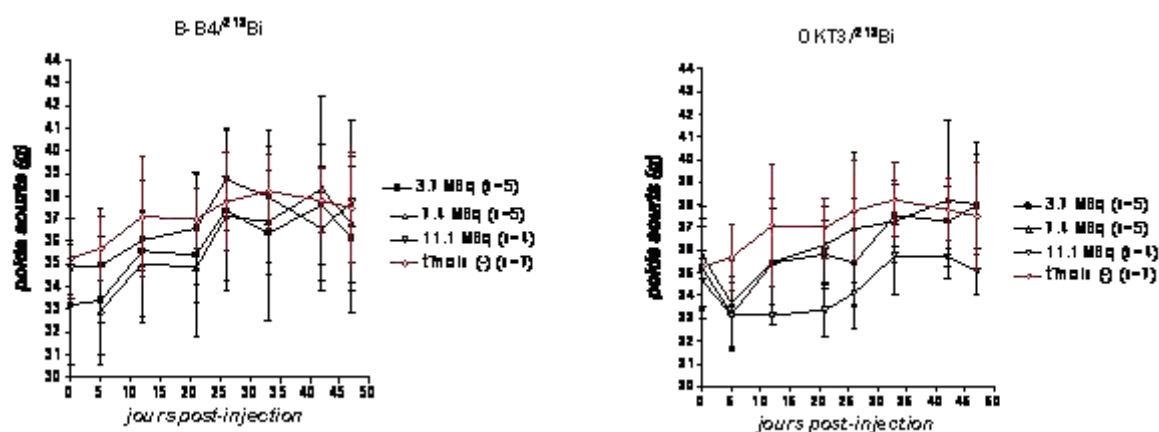


Figure 29. Etude comparative du poids des souris ayant reçu les activités suivantes : 3,7-7,4 et 11,1 MBq (100-200-300 μCi) des anticorps B-B4 et OKT3 couplés au ^{213}Bi .

c. Evaluation de la spécificité du ciblage de l'anticorps B-B4 couplé au ^{213}Bi

Nous avons démontré l'absence d'activité biologique de l'anticorps B-B4, cependant une efficacité thérapeutique est observée. L'effet observé est associé à l'action des rayonnements ionisants. Nous avons donc comparé les effets observés après injection de l'anticorps B-B4 couplé au ^{213}Bi avec la réponse tumorale obtenue après administration de l'anticorps OKT3 couplé au ^{213}Bi . Nous avons couplé cet anticorps dans les mêmes conditions expérimentales (cf. Matériels et méthodes). Les résultats sont présentés dans la figure 30.

Cette étude comparative nous a permis de constater un effet dépendant de l'activité administrée de l'anticorps OKT3 couplé au ^{213}Bi . La DMT fixée dans le premier essai de RIT

(11,1 MBq soit 300 μ Ci) permet d'obtenir un effet similaire après administration de l'anticorps spécifique ou non.

En accord avec les données de biodistribution (figure 17-19), l'utilisation d'un anticorps complet pour la RIT α d'une tumeur solide ne permet pas un ciblage spécifique des cellules tumorales avec le ^{213}Bi . Sa période de 45,6 minutes est trop courte pour pouvoir obtenir un effet concomitant avec une accumulation de l'anticorps au sein de la tumeur par fixation spécifique sur les cellules tumorales. La réponse tumorale observée est donc essentiellement dépendante d'une irradiation non spécifique.

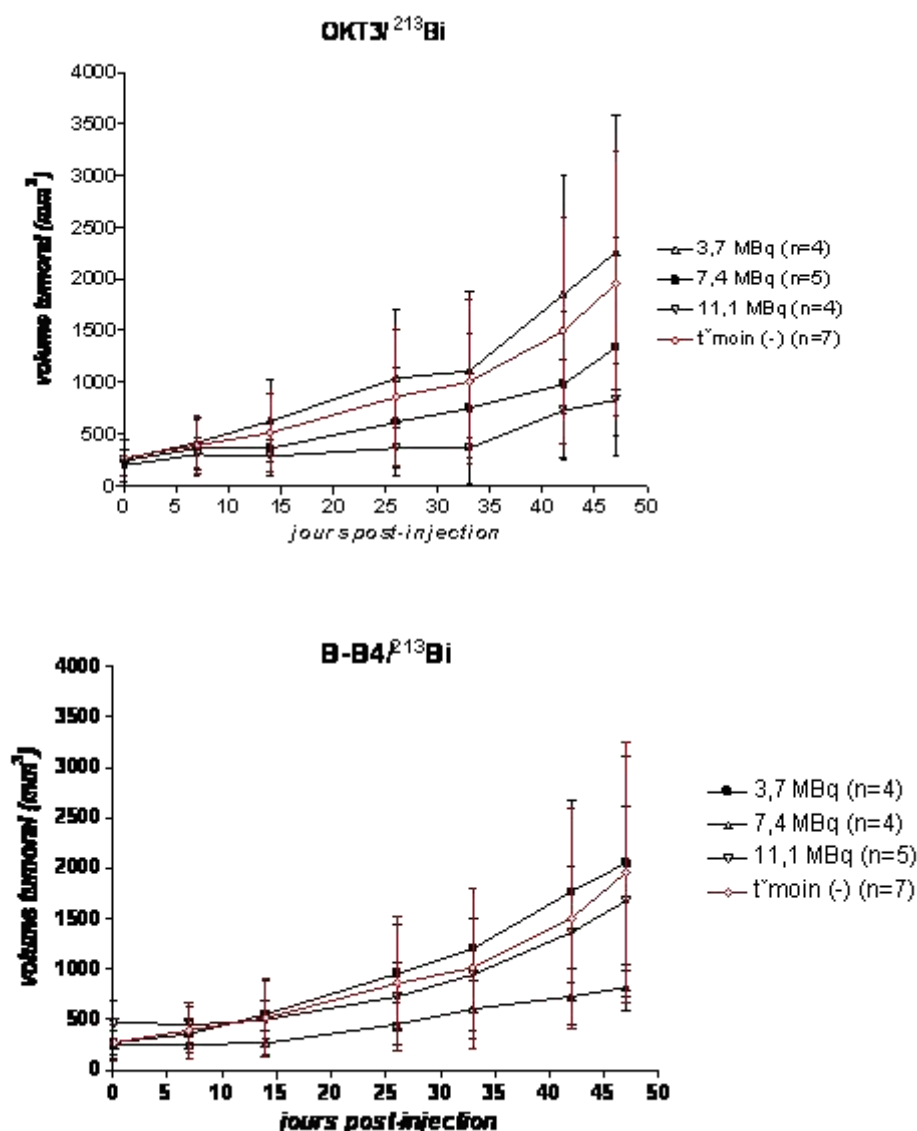


Figure 30. Etude comparative de la réponse tumorale d'un anticorps spécifique (B-B4) et non spécifique (OKT3), couplés au ^{213}Bi . Les activités suivantes ont été testées : 3,7 MBq, 7,4 MBq et 11,1 MBq (100-200-300 μ Ci).

Compte tenu de la courte demi-vie du ^{213}Bi (45,6 minutes) et de la non spécificité de l'effet observé après administration de l'anticorps B-B4, nous avons supposé que le micro-environnement tumoral était atteint par le radioélément bien avant la tumeur en elle-même. Afin d'utiliser à bon escient le ^{213}Bi dans notre modèle de carcinome mammaire, il était indispensable de trouver une cible antigénique rapidement accessible pour pouvoir optimiser le dépôt d'énergie du ^{213}Bi . Le ciblage de l'endothélium vasculaire est une piste déjà explorée dans de nombreux types de tumeurs, mais reste à prouver en RIT alpha. L'injection intraveineuse d'un radioimmunoconjugué spécifique de l'endothélium permet un accès rapide au micro-environnement tumoral. Nous avons donc choisi l'endoglin (CD105), dont l'expression caractéristique au niveau des cellules endothéliales activées, constitue un marqueur de mauvais pronostic dans de nombreux types de carcinome, dont le cancer du sein.

IV. Ciblage de la néo-vascularisation tumorale en RIT alpha

1. Choix de l'endoglin (CD105)

Le ciblage du CD105 est intéressant, dans la mesure où il permet d'accéder à des cellules endothéliales activées appartenant au microenvironnement tumoral. Cette démarche va permettre d'accéder directement et rapidement à la cible antigénique par la circulation sanguine. De plus, l'endoglin constitue aujourd'hui un indicateur de progression tumorale et permet de diagnostiquer les patients à risque. Nous avons donc choisi de cibler cet antigène en utilisant l'anticorps MJ7/18, anticorps de rat, d'isotype IgG2a. Cet anticorps monoclonal a été couplé au ^{213}Bi selon le protocole utilisé pour le marquage des anticorps étudiés précédemment (A.I.a/b).

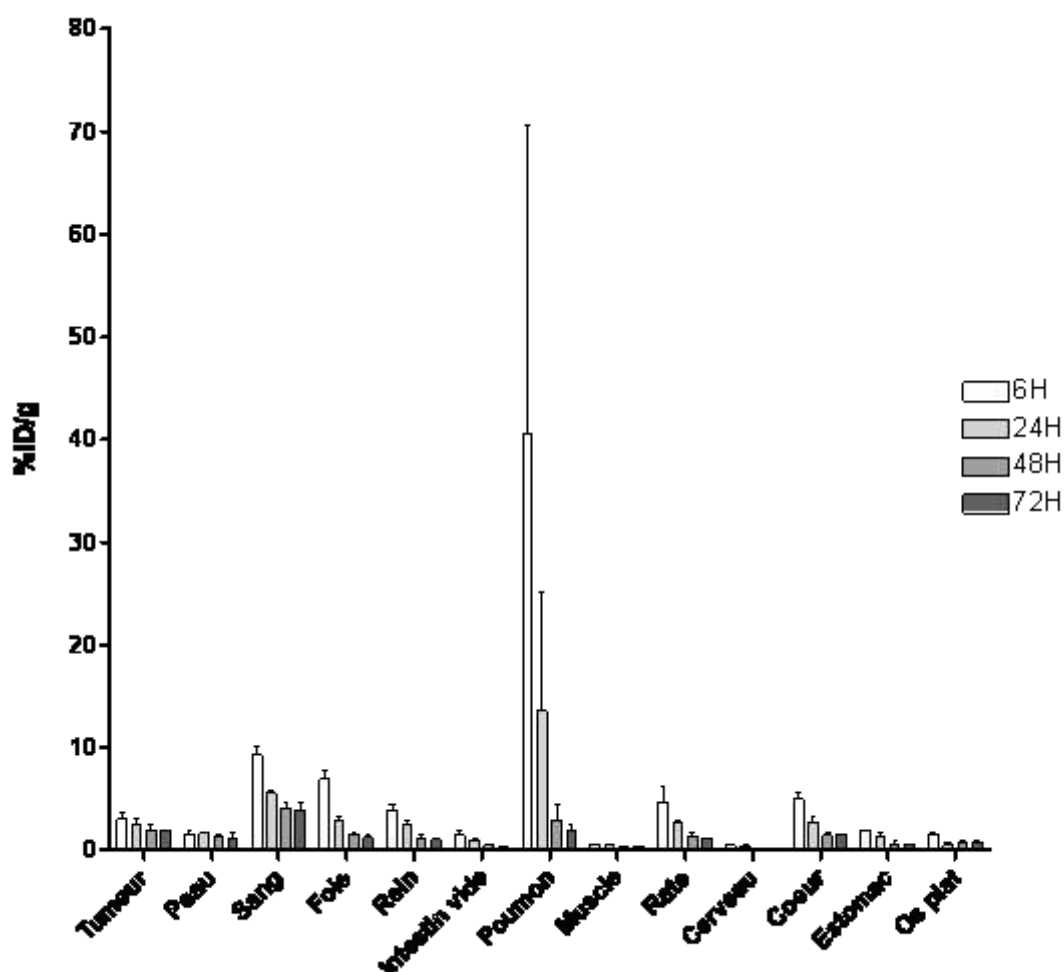
2. Etude de la biodistribution de l'anticorps MJ7/18

Cette étude nous a permis de suivre la fixation de l'anticorps MJ7/18 au niveau de chacun des organes de souris *nude* préalablement greffées avec 5×10^6 de cellules de la lignée MDA-MB-468. L'anticorps MJ7/18 a été couplé à l' ^{125}I , avec un rendement de l'ordre de 90% et une activité spécifique de 333 kBq/ μg (9 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$). Une quantité constante du

radioimmunoconjugué (7,9 μ g) a été administrée aux souris 36 jours après la greffe. Les différents organes ont été prélevés à 4, 24, 48 et 72 heures

La fixation tumorale du MJ7/18 atteint son maximum au bout de 6h, avec $3 \pm 0,62$ %ID/g. Le taux de fixation décroît ensuite jusqu'à 48h pour se stabiliser jusqu'à 72h avec $1,95 \pm 0,06$ %ID/g. La quantité d'anticorps au niveau sanguin est 3 fois plus élevée à 6h ($9,28 \pm 0,8$ %ID/g), que celle mesurée au niveau tumoral ($3 \pm 0,62$ %ID/g). Les plus forts taux de fixation sont observés ensuite pour les organes les plus vascularisés : cœur, foie, rate. La distribution au niveau du poumon est surprenante. Le taux de fixation au poumon dépasse les 40% de fixation ($40,55 \pm 30,13$ %ID/g), 6h après l'injection du radioimmunoconjugué. Ce taux décroît ensuite très rapidement pour atteindre une valeur minimale de $1,85 \pm 0,53$ %ID. Cette fixation excessive pose un problème de toxicité potentielle lorsque cet anticorps est radiomarké. Cependant, la biodistribution de cet anticorps au niveau pulmonaire varie énormément d'une souris à l'autre avec des valeurs comprises entre 14 et 61% à 6h puis de 5 à 21% à 24h. Ces niveaux de fixation sont élevés comparativement à ceux publiés pour le même anticorps (Lee, Hong et al. 2009). Dans le cadre de notre étude, il est possible que cette fixation reflète un problème sanitaire, avec une fixation augmentée pour des souris atteintes d'une infection respiratoire. Cette hypothèse doit être confirmée en réévaluant la biodistribution de cet anticorps.

Nous n'avons pas observé de fixation importante à la tumeur. Ces résultats ne sont pas surprenants dans la mesure où la fixation sur les vaisseaux tumoraux rapportée au gramme de tumeur peut difficilement rendre compte d'une fixation spécifique.



	6h		24h		48h		72h	
	%ID/g	SD	%ID/g	SD	%ID/g	SD	%ID/g	SD
Tumeur	3	0,62	2,47	0,56	1,92	0,55	1,95	0,06
Peau	1,57	0,26	1,65	0,07	1,25	0,2	1,21	0,48
Sang	9,28	0,8	5,58	0,17	4,09	0,59	3,9	0,69
Foie	6,94	0,8	2,88	0,41	1,55	0,24	1,26	0,19
Rein	3,88	0,59	2,51	0,32	1,2	0,3	1,06	0
Intestin vide	1,48	0,46	0,91	0,16	0,48	0,09	0,37	0,01
Poumon	40,55	30,13	13,6	11,52	2,88	1,54	1,85	0,53
Muscle	0,62	0,03	0,54	0,03	0,34	0,08	0,35	0,01
Rate	4,68	1,46	2,58	0,21	1,36	0,34	1,16	0,04
Cerveau	0,46	0,1	0,39	0,07	0,18	0,05	0,16	0,01
Coeur	4,97	0,59	2,65	0,56	1,42	0,25	1,53	0
Estomac	1,87	0,08	1,4	0,27	0,61	0,21	0,56	0,03
Os plat	1,53	0,15	0,53	0,18	0,73	0,08	0,73	0,08

Figure 31. Etude de la biodistribution de l'anticorps MJ7/18 couplé à ^{125}I sur souris *nude* préalablement greffées avec 5×10^6 de cellules MDA-MB-468. L'anticorps MJ7/18 couplé à ^{125}I a été administré 36 jours après la greffe. Les souris ont été ensuite sacrifiées à J6, J24, J48 et J72, pour pouvoir prélever chacun des organes.

Nous avons cherché à comparer la biodistribution de l'anticorps MJ7/18 avec celle des anticorps B-B4 et 7D4 couplés à l' ^{125}I (figure 17-19), que nous avons présentée dans la première partie de ce travail de thèse. Les résultats sont présentés dans la figure 32.

Nous avons évalué la fixation de l'anticorps MJ7/18 au niveau des néo-vaisseaux tumoraux. Cette fixation est cependant relativement faible par rapport à la masse tumorale totale. Il est donc difficile de faire la différence entre le taux mesuré au niveau du sang, qui reste plus élevé, et le taux de fixation au niveau tumoral. Par ailleurs, l'accumulation au niveau du sang est directement liée au taux de fixation au niveau des néo-vaisseaux, il était donc judicieux d'évaluer le rapport de fixation de l'anticorps MJ7/18 au niveau de la tumeur par rapport au sang. Lorsque l'on étudie les résultats du rapport de fixation tumeur/sang, nous pouvons constater une accumulation légèrement supérieure pour l'anticorps MJ7/18 par rapport au 7D4, non spécifique de la tumeur ciblée. Ces résultats sont donc encourageant quant à la spécificité de l'anticorps MJ7/18 pour la néo-vascularisation tumorale.

Le taux de fixation de l'anticorps MJ7/18 mesuré aux poumons à 6h, anormalement élevé, a pour conséquence une diminution la dose circulante de l'anticorps radiomarqué, sous-estimant ainsi l'accumulation de l'anticorps au niveau des autres organes. Une étude immunohistochimique à l'aide d'un anticorps MJ7/18 pur, c'est-à-dire dépourvue d'immunoglobulines de veau, est envisagée pour pouvoir évaluer de manière objective la fixation de cet anticorps au niveau de la néo-vascularisation tumorale. De plus, les taux de fixation au sang de l'anticorps B-B4 radiomarqué à l' ^{125}I sont discutables dans la mesure où la valeur des écart-type est anormalement élevée.

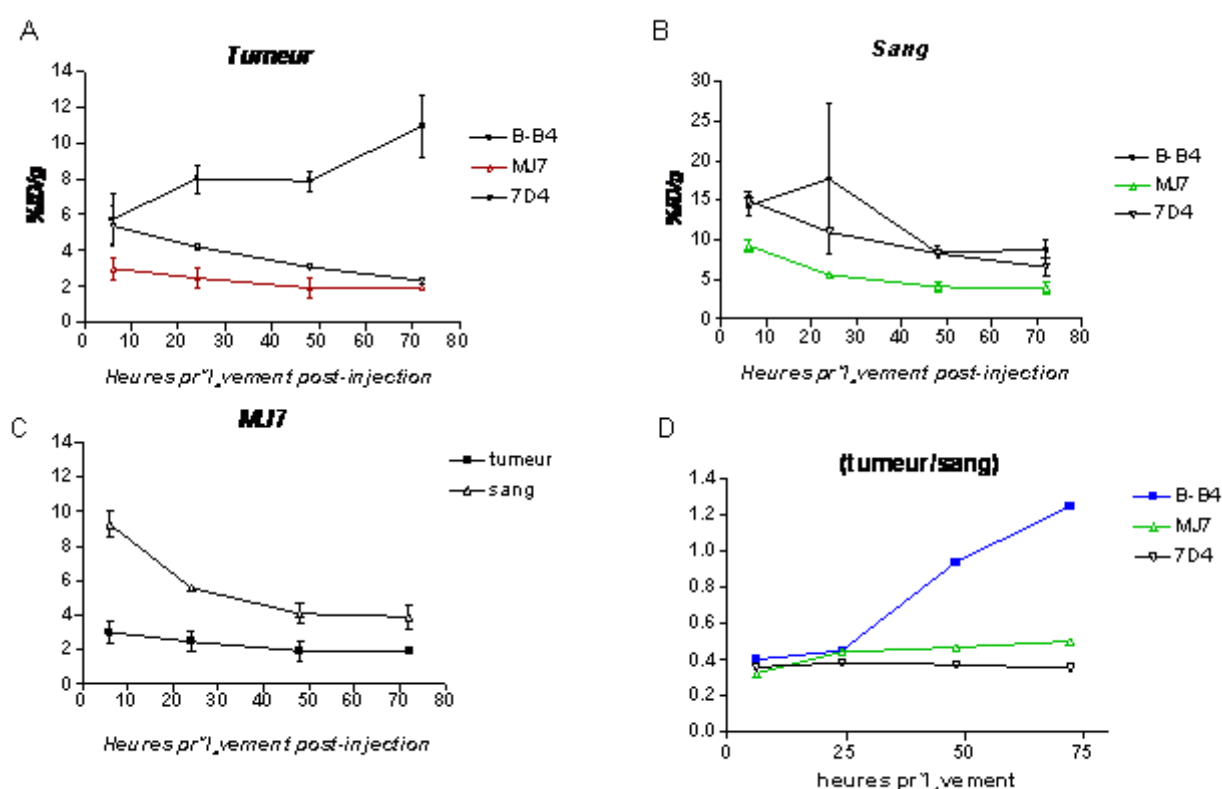


Figure 32. Etude comparative des différentes biodistributions des anticorps MJ7/18, B-B4 et 7D4 couplés à l' ^{125}I . **A.** Evaluation de la fixation tumorale des 3 anticorps. **B.** Evaluation de la fixation au niveau du sang des 3 anticorps. **C.** Etude comparative de la distribution de l'anticorps MJ7/18 au niveau tumoral et sanguin. **D.** Rapport du taux de fixation des anticorps B-B4/ MJ7 et 7D4 couplés à l' ^{125}I au niveau de la tumeur par rapport au taux de fixation au niveau sanguin.

Malgré les résultats surprenants de biodistribution au niveau du poumon, nous avons entrepris un test de RIT alpha à l'aide de l'anticorps MJ7/18 couplé au ^{213}Bi en restant vigilant sur une toxicité éventuelle, résultant d'une fixation anormale de l'anticorps aux poumons.

3. RIT alpha utilisant l'anticorps MJ7/18 couplé au ^{213}Bi

Cette étude a été réalisée sur souris *nude* préalablement greffées avec 5×10^6 de cellules de la lignée MDA-MB-468. L'anticorps MJ7/18 a été couplé au ^{213}Bi selon le même protocole suivi pour le marquage des anticorps B-B4, avec un pourcentage de fixation moyen de 82,2% et une activité spécifique de 1,4 MBq/mg (38,5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) d'anticorps. Nous avons choisi de comparer l'efficacité de l'anticorps MJ7/18 avec celui de l'anticorps OKT3,

spécifique du CD3, utilisé pour l'évaluation de la spécificité du ciblage du syndecan-1 en RIT α .

L'administration des trois anticorps, B-B4, OKT3 et MJ7/18 couplés au ^{213}Bi , a permis de retarder la croissance tumorale, sur une dizaine de jours, c'est-à-dire entre J10 et J20. Cependant si l'on compare l'effet des trois anticorps à doses équivalentes, l'anticorps MJ7/18 apparaît comme le plus efficace, dès la première activité administrée (3,7 MBq). Aux plus fortes doses, la réponse tumorale est comparable quelque soit l'anticorps utilisé ce qui reste cohérent avec l'hypothèse d'une irradiation de la tumeur sans ciblage spécifique.

L'anticorps MJ7/18 utilisé au cours de cette étude a été produit au sein de notre laboratoire. La pureté de l'anticorps n'est cependant pas optimale. En effet, les rendements de production restent faibles et cette production a été effectuée dans un milieu de culture contenant du sérum de veau foetal contenant une quantité non négligeable d'immunoglobulines. Ces immunoglobulines de veau sont purifiées avec l'anticorps MJ7/18 lors de la chromatographie sur colonne de protéine G (cf. Matériels et méthodes). L'anticorps MJ7/18 ainsi produit est donc fortement contaminé par les Ig de veau qui une fois marquées au ^{213}Bi peuvent se fixer de façon non spécifique. Par conséquent, les quantités d'anticorps MJ7/18 marquées et disponibles pour un ciblage spécifique de la néo-vascularisation tumorale sont diminuées. La mise en place de conditions de production dans un milieu de culture appauvri en sérum de veau foetal est actuellement en cours au sein de notre équipe. Lorsque ce problème sera résolu, nous pourrons envisager de travailler à des activités inférieures à 3,7 MBq, activité à laquelle on observe déjà une efficacité. La diminution de la dose thérapeutique pourra permettre de limiter la toxicité du traitement et envisager une association de ce traitement anti-angiogénique en RIT α avec d'autres approches thérapeutiques anti-tumorales afin d'obtenir une synergie et améliorer la réponse tumorale.

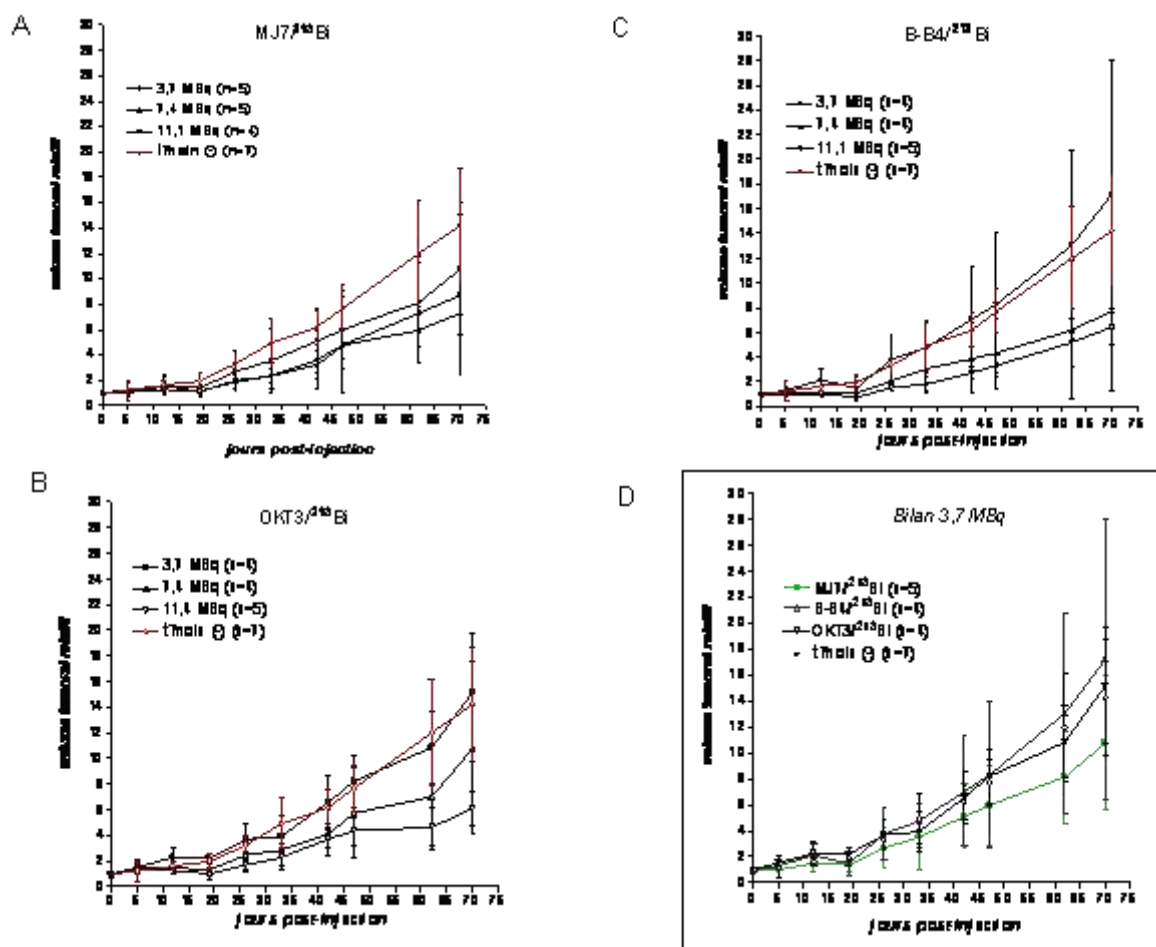


Figure 33. Etude comparative de la réponse tumorale après administration des anticorps MJ7/18 (spécifique de l'endogline) (A), OKT3 (spécifique du CD3) (B) et B-B4 (spécifique du syndecan-1) (C) couplés au ^{213}Bi . Les activités administrées ont été les suivantes : 3,7-7,4 et 11,1 MBq (100-200-300 μCi). Les volumes tumoraux représentés sont relatifs aux volumes initiaux mesurés. Les courbes surlignées en rouge correspondent aux valeurs du témoin. La figure D représente une étude comparative de l'effet des 3 radioimmunoconjugués administrés pour l'activité de 3,7 MBq. La courbe surlignée en vert correspond aux données du MJ7/18/ ^{213}Bi .

Compte tenu de la courte demi-vie physique du ^{213}Bi qui constitue un facteur limitant nos essais pré-cliniques, il était important d'évaluer l'efficacité d'un autre émetteur de particules α , permettant de s'affranchir de ces contraintes. Nous avons choisi l' ^{211}At . Ce radioélément nous est fourni par le cyclotron d'Orléans. Il constitue une alternative intéressante au ^{213}Bi , avec sa demi-vie de 7,2h.

Les quantités d' ^{211}At disponibles actuellement sont limitées pour deux raisons: les quantités produites par le cyclotron d'Orléans sont faibles et une partie de l'astate produit est dédiée à la mise en place de protocoles de purification et de marquage des anticorps. Nous sommes donc limités dans nos approches pré-cliniques de RIT utilisant l' ^{211}At , car il n'est pas

possible actuellement de procéder à l'injection de plus de deux ou trois souris avec un anticorps marqué à l' ^{211}At . Nous avons donc choisi d'utiliser les doses d' ^{211}At disponibles pour effectuer une expérience de réinjection sur un lot limité de souris. Le ciblage de l'endoglin se prêtait bien à ce type d'expérimentation dans la mesure où l'effet anti-tumoral recherché devait être obtenu à faibles doses.

4. RIT alpha fractionnée utilisant l'anticorps MJ7/18 couplé à l' ^{211}At

a. Radiomarquage de l'anticorps MJ7/18

La méthode de radiomarquage utilisée est dite "indirecte". Elle s'effectue en 2 étapes utilisant dans un premier temps la substitution électrophile d'un groupement partant, de type trialkylstannyl par de l'astate préalablement oxydé par de la N-chlorosuccimide sous une forme At^+ . Ce synthon bifonctionnel est dans un second temps couplé, via une fonction ester activée de type N-hydroxysuccinimidyl, à une fonction amine présente sur un résidu lysine de l'anticorps MJ7/18. L'équipe de chimistes de notre unité de recherche a réalisé ce radiomarquage, après extraction de la cible par voie humide, technique innovante de purification. La mise en place de la technique classique de purification par distillation (voie sèche) est effectuée en parallèle.

b. Etude du potentiel toxique de l' ^{211}At couplé au MJ7/18

Nous avons choisi de réaliser une étude de dose fractionnée compte tenu de la faible disponibilité de l' ^{211}At , au sein du laboratoire. Néanmoins, cette approche nous permet de diminuer la toxicité aux tissus sains tout en augmentant la dose cumulée à la tumeur. Le radioimmunoconjugué a été administré à des souris *nude* préalablement greffées avec 5×10^6 de cellules MDA-MB-468. La première injection a été réalisée 25 jours après la greffe. 0,37 MBq (10 μCi) d' ^{211}At couplé à l'anticorps MJ7/18 ont été administrés par voie intraveineuse. Une seconde injection, plus élevée, de 0,67 MBq (18 μCi), a suivi, 57 jours après le début du traitement. La pureté radiochimique de chaque radioimmunoconjugué administré est restée supérieure à 90%.

Nous avons évalué l'efficacité du traitement par un suivi hebdomadaire du volume tumoral. Les résultats sont présentés dans la figure 34.

Le ciblage de l'endoglin associée aux effets des rayonnements ionisants de l' ^{211}At est concluant. Nous avons obtenu un ralentissement de la croissance tumorale par rapport au groupe témoin n'ayant pas reçu de traitement. Une stabilisation de la croissance tumorale est obtenue après chaque injection et est illustrée par deux plateaux, le premier entre J10 et J20 et le second entre J50 et J65. Bien que ces résultats soient préliminaires, la RIT à l'aide de l'anticorps MJ7/18 couplé à l'astate confirme les résultats obtenus à l'aide du même anticorps couplé au ^{213}Bi . Cet effet est obtenu à des doses faibles de radiopharmaceutiques. Des expériences additionnelles d'escalade de doses avec un anticorps MJ7/18 de bonne qualité sont envisagées pour confirmer ces résultats et évaluer la potentiel thérapeutique de cette stratégie de ciblage vasculaire.

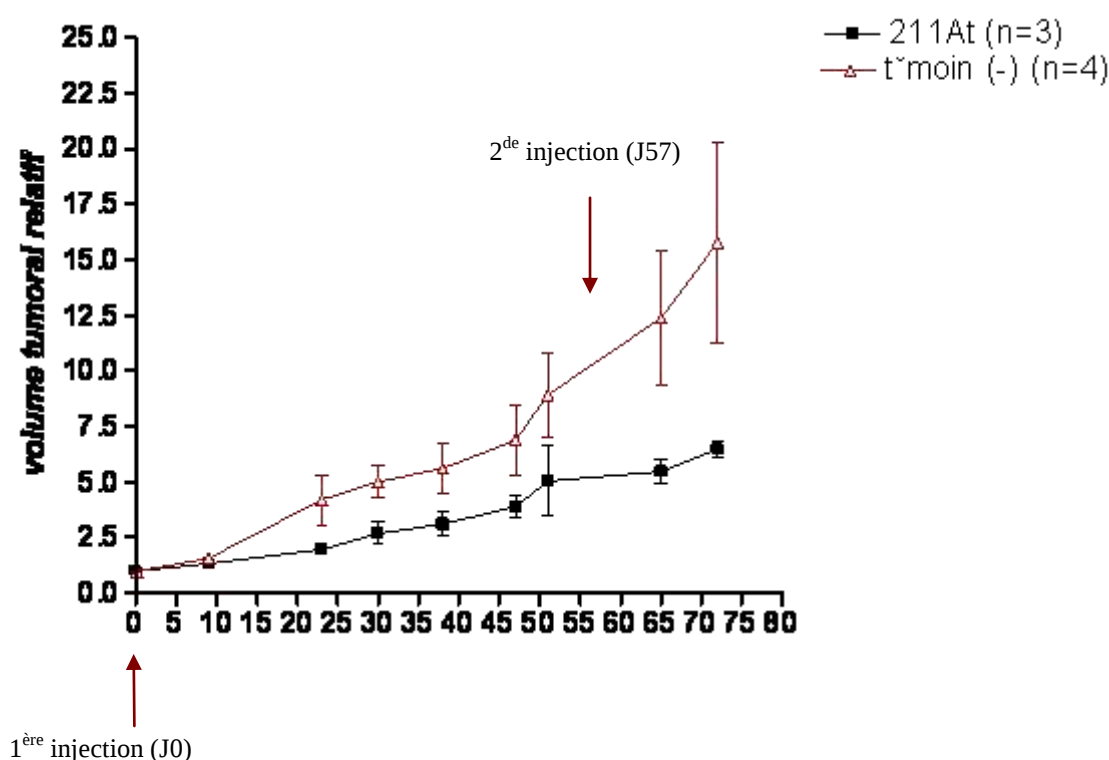


Figure 34. Etude du potentiel thérapeutique de l'anticorps MJ7/18 couplé à l' ^{211}At . Cette étude a été réalisée sur souris *nude* préalablement greffées avec 5×10^6 cellules appartenant à la lignée MDA-MB-468. Deux activités, 0,37 MBq (10 μCi) et 0,67 MBq (18 μCi), ont été administrées à J0 et J57. Le volume tumoral est exprimé en mm^3 . Le groupe témoin n'a pas reçu de traitement.

C. Etude de la toxicité hématologique de l' ^{211}At couplé au MJ7/18

Nous avons réalisé parallèlement à cette étude un bilan hématologique sur les souris traitées par l'anticorps MJ7/18 marqué à l' ^{211}At , bien qu'aucune perte de poids n'ait été observée durant l'étude. Les prélèvements ont été réalisés à l'œil, toutes les 2 semaines, après le début du traitement. Une numération leucocytaire, plaquettaire et érythrocytaire nous permet d'évaluer la toxicité aigue au niveau des précurseurs myéloïdes.

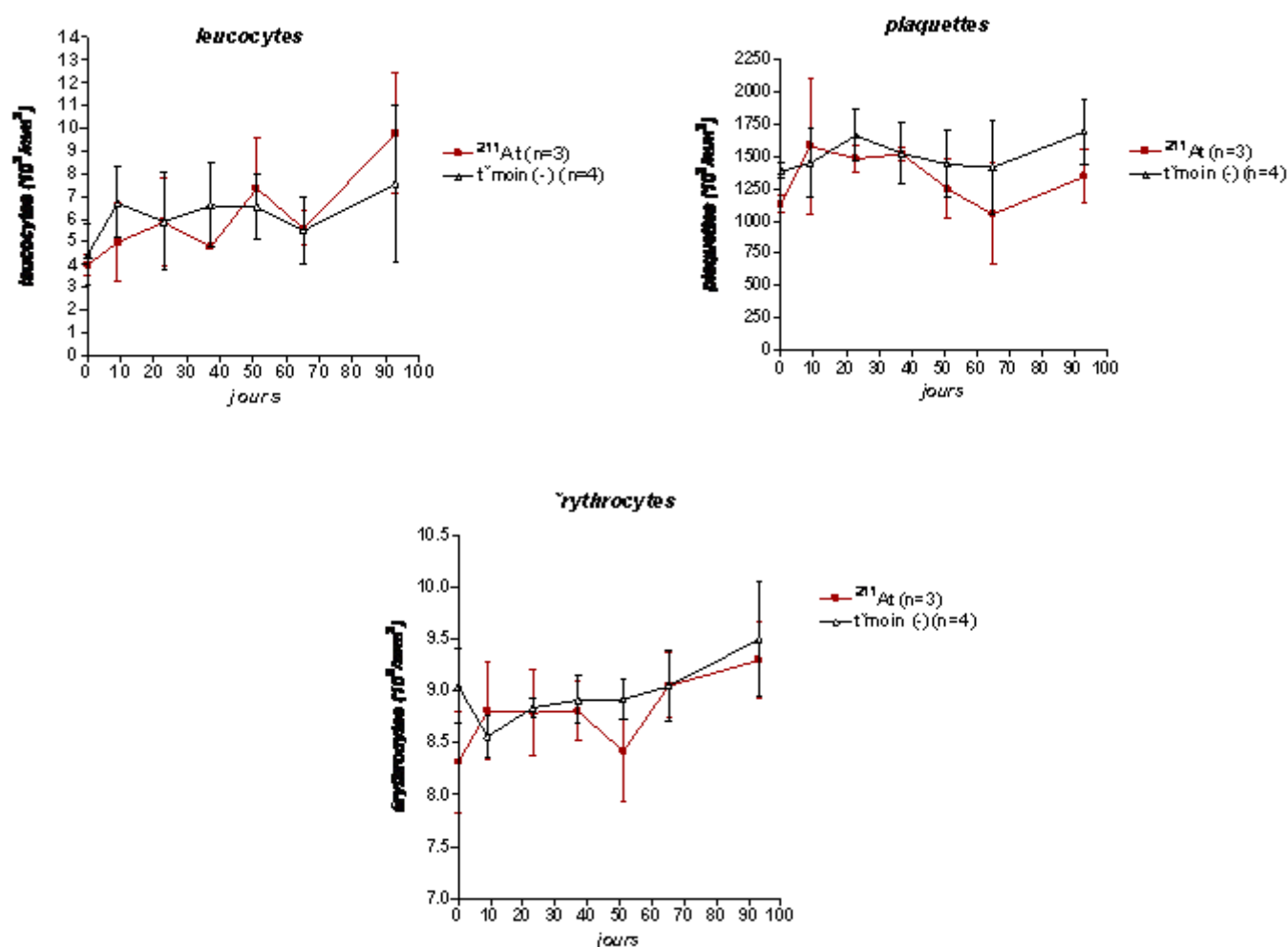


Figure 35. Bilan hématologique réalisé sur souris *nude* préalablement greffées avec 5×10^6 cellules appartenant à la lignée humaine de carcinome mammaire MDA-MB-468. Les souris ont été traitées avec le radioimmunoconjugué formé par l'anticorps MJ7/18 couplé à l' ^{211}At . Les prélèvements ont été réalisés à l'œil, toutes les deux semaines qui ont suivi le début du traitement.

La toxicité hématologique est très limitée pour les doses utilisées. Aucune différence significative n'est observable avec le lot de souris témoins. Cette étude préliminaire est donc très encourageante et confirme les résultats obtenus avec le même anticorps couplé au ^{213}Bi .

Comme nous l'avons mentionné précédemment les travaux relatifs à l'utilisation d' ^{211}At ne sont pas à l'heure actuelle d'un abord facile pour des raisons de disponibilité. Ce problème devrait être résolu rapidement lorsque la production d' ^{211}At au cyclotron ARRONAX nous permettra d'accéder à des doses suffisantes pour les essais pré-clinique. Dans l'immédiat ces résultats vont être confirmés avec des lots d'anticorps MJ7/18 produit en milieu sans sérum, ce qui devrait limiter la toxicité du traitement tout en potentialisant ses effets. La comparaison de l'efficacité de l' ^{211}At ou du ^{213}Bi dans cette approche de RIT sera effectuée. A réponse tumorale équivalente, notre attention se portera dans un premier temps sur la toxicité de chacune de ces approches. Le ciblage de la vascularisation tumorale est en effet envisagé en association avec d'autres approches de thérapies des cancers (RIT β , chimiothérapie). Il est essentiel que ces associations n'entraînent pas une toxicité supérieure à celle observée pour chaque traitement pris séparément et qu'elle s'accompagne d'un effet synergique sur la réponse.

Matériels et méthodes

A. Mise en place des modèles pré-cliniques

I. Culture des différentes lignées cellulaires

Les lignées cellulaires utilisées ont toutes été cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Biomédia, Boussens, France), 2mM de glutamine (Gibco, Cergy Pontoise, France), 100 U/ml de pénicilline (Sigma) et 0,1 mg/ml de streptomycine (Sigma) en milieu RPMI 1640 (Sigma). Elles ont été placées dans un incubateur à 37 °C, dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂ et 100 % d'humidité.

1. La lignée MDA-MB-468

Le modèle de cancer du sein humain a été développé sur souris *nude*, à partir d'une lignée humaine de cancer du sein, MDA-MB-468 obtenue auprès de l'ATCC (HTB-132). Elle fut isolée par l'équipe du professeur R.Cailleau, à partir de l'épanchement pleural d'une patiente atteinte d'un adénocarcinome mammaire métastatique. Elle exprime l'*Epidermal Growth Factor* (EGF), le *Transforming Growth Factor* (TGF), et le CD138 dit syndecan-1 (Cailleau, Olivé et al. 1978). Les cellules MDA-MB-468, adhérentes, sontensemencées à une concentration de $1,5 \times 10^5$ cellules/ml. Les cellules sont détachées par addition de trypsine (Sigma) à 0,25% du volume puis placées à 37°C jusqu'à leur détachement complet. La réaction est alors inhibée par addition de sérum de veau fœtal (SVF). Après rinçage, les cellules sont repiquées.

2. La lignée U266

La lignée U266 humaine de myélome multiple nous a permis de caractériser l'anticorps BB-4 dirigé contre le CD138 humain, et confirmer les résultats obtenus sur la lignée MDA-MB-468 exprimant également cet antigène. La lignée a été obtenue auprès de l'ATCC (TIB-196). La lignée U266 estensemencée à raison de $1,5 \times 10^5$ cellules/ml.

II. Les anticorps

L'ensemble des anticorps utilisés au cours de cette étude est resté sous forme d'Immunoglobuline G totale. L'anticorps monoclonal B-B4 obtenu auprès de la société Diaclone Research (Besançon, France) d'isotype IgG1, d'origine murine, est spécifique du CD138 humain. L'anticorps 7D4 murin, de même isotype spécifique du complexe HLA-A2/Mage3, a été produit au sein de notre équipe, et est utilisé à titre d'anticorps non spécifique, pour nos essais de RIT β (Bernardeau, Gouard et al. 2005). L'OKT3 est un anticorps monoclonal de souris (IgG2a) dirigé contre la chaîne gamma du CD3, l'hybridome a été obtenu auprès de l'ATCC (CRL-8001). Cet anticorps est également utilisé en tant que marqueur non spécifique, pour nos études de RIT α . L'anticorps MJ7/18/18, produit à partir d'un hybridome obtenu auprès de BD Biosciences (Le Pont en Claix, France), d'isotype IgG2a, est dirigé contre le CD105 (endoglin) (Ge and Butcher 1994). Les anticorps OKT3 et MJ7/18 ont été produits par une purification sur colonne de protéine G (Amersham Biosciences, Orsay, France).

III. Production des anticorps MJ7/18 et OKT3

1. Culture des hybridomes

Chaque hybridome a été produit dans un milieu RPMI 1640 (*Sigma*), contenant 10 % de sérum de veau fœtal (*Bio media*), de la glutamine (2mM), de la pénicilline (1000 U/ml) et de la streptomycine (1 mg/ml). Ils ont été placés dans un incubateur à 37 °C, dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂ et 100 % d'humidité. Ensemencés à 0,1 millions de cellules/ml, le surnageant des hybridomes a été récupéré deux fois par semaine, lorsque le taux de mortalité atteignait $\pm$ 50%. Une purification des anticorps a été envisagée lorsque nous obtenions 500 ml de surnageant minimum.

2. Purification des anticorps sur colonne de protéine G

Selon les instructions du constructeur, la purification sur la colonne de protéine G nécessite la préparation de trois tampons A, B, et C. Le tampon A est utilisé pour équilibrer la

colonne et permettre la fixation aux protéines G des protéines présentant la partie Fc de l'anticorps. Ce tampon contient 20 mM de phosphate et présente un pH égal à 7 pour permettre la fixation des Ig2b de souris. Le tampon B est le tampon d'élution constitué de glycine 0,1M à pH compris entre 2,5 et 3 pour pouvoir décrocher les protéines associées aux protéines G. Le tampon C correspond à du Tris-HCl 1M à pH 9 et permet de ramener à un pH neutre les fractions collectées après élution à pH acide.

Le surnageant de chaque hybridome est préalablement dilué au 1/3 dans une solution de PBS 1X puis filtré sur 0,45µm. La colonne est équilibrée avec 5 à 10 volumes de tampon A à un débit de 1ml par minute. Le surnageant est ensuite passé sur la colonne de protéine G à un débit de 3 ml par minute. Après un lavage avec 5 à 10 volumes de tampon B en fraction de 900 µL dans des eppendorfs contenant 100µL de tampon C pour neutraliser le pH acide du tampon B. L'absorbance de chacune des fractions est ensuite mesurée à 280 nm. Les fractions contenant les protéines éluées sont regroupées puis placées dans un bain de dialyse en PBS 1X sur la nuit, pour pouvoir les conditionner ensuite dans un tampon à pH neutre, permettant leur conservation à 4°C.

IV. Caractérisation de l'anticorps B-B4

1. Marquage de l'anticorps à l'iode 125 (¹²⁵I)

L'anticorps B-B4 est marqué à l'¹²⁵I (Perkin Elmer, Billerica, MA) à l'aide du Iodo-Gen (1-3-4-6-Tétrachloro-3a-6a-Diphénylglycouril, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). Cette molécule est un oxydant puissant qui permet de transformer l'¹²⁵I fourni, sous sa forme chimique stable I⁻, en espèce I⁺ capable de se fixer, par substitution électrophile, sur les noyaux aromatiques activés des tyrosines de la protéine à marquer (Fraker and Speck 1978). Ce type de marquage permet d'avoir des activités spécifiques élevées de l'ordre de 370 MBq/mg (10 mCi/mg) d'anticorps. Le Iodo-Gen est repris dans du dichlorométhane à une concentration de 1mg/ml puis distribué par fraction de 100 µL dans des tubes en verre (100 µg/tube). Une fois évaporés sous sorbonne, les tubes sont conservés à -20°C. Le marquage est réalisé en incubant l'anticorps et l'¹²⁵I dans un tube recouvert par le Iodo-Gen replit avec du tampon phosphate 0,1M pH 7,2 pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation douce. Le volume prélevé d'¹²⁵I va dépendre de la calibration de la source réalisée le jour du marquage. L'anticorps marqué est ensuite purifié sur une colonne Sephadex PD10

(Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France). L'élution de l'anticorps marqué est effectuée par fractions de 500 μ L avec du PBS 1X. La radioactivité contenue dans les fractions est évaluée au compteur γ (1480 Automatic Gamma counter, Wallac, Billerica, MA) et celles contenant l'anticorps radiomarké sont regroupées. Les rendements de marquage et de purification sont estimés par chromatographie sur couche mince ITLCTM –SG (Pall Corporation, Fontenay-sous-Bois, France). Pour cette chromatographie, 1 μ L de la solution de marquage de l'anticorps est déposé à environ 1 cm du bas d'une plaque ITLCTM –SG d'environ 9 cm. La migration est réalisée en plaçant le bas de la plaque dans 3 mL d'acide trichloroacétique 10% (Prolabo, Paris, France). Lorsque le front de migration a quasiment atteint le haut de la plaque, elle est coupée en deux de façon à compter le haut et le bas de la plaque au compteur γ . L'iode libre non fixé à l'anticorps migre avec le solvant et sera donc retrouvé sur la partie haute de la plaque ITLCTM –SG alors que l'anticorps radiomarké reste dans le bas de la bandelette. Le comptage de ces deux parties permet d'obtenir le pourcentage de fixation de ^{125}I à l'anticorps. Le rendement de marquage est supérieur à 95% avec des activités spécifique de l'ordre de 200 MBq/mg (5,4 mCi/mg).

2. Test d'immunoréactivité des anticorps : analyse par la méthode de Lindmo

Le radiomarquage d'un anticorps peut diminuer son immunoréactivité. Il est donc essentiel de mesurer après cette étape, sa capacité de fixation à sa cible antigénique. La méthode de référence est celle de Lindmo (Lindmo et coll. 1984). L'immunoréactivité de l'anticorps B-B4 a été déterminée par cette technique, à l'aide de la lignée U266, lignée de myélome multiple humaine. Le test est réalisé sur une gamme de suspensions de la lignée cellulaire mis en présence d'une seule concentration d'anticorps radiomarké. En effet, il est nécessaire de se placer en excès d'antigènes et la concentration d'anticorps utilisée doit permettre la saturation des sites antigéniques. Le test est réalisé en duplicate en incubant une gamme de 9 dilutions réalisées dans du PBS 1X de la lignée cellulaire U266. Après 2h d'incubation à 4°C, sous agitation douce, la radioactivité liée aux cellules est séparée de celle liée aux anticorps libres, par le biais d'un mélange de 90% de dibutylphthalate (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) et de 10 % d'huile de paraffine (Merck, France) par centrifugation de 3 minutes à 12000 tours par minute. La radioactivité présente dans les deux phases est

mesurée au compteur γ (Wallac, Billerica, MA). La fixation non spécifique de l'anticorps B-B4 couplé à l' ^{125}I est évaluée en présence d'un excès de 100 fois d'anticorps non radiomarqué. Cette valeur est ensuite soustraite à la fixation spécifique.

3. Test de liaison à l'équilibre

Le test de fixation à l'équilibre est réalisé en triplicate en incubant 1×10^6 cellules avec une gamme de concentration d'anticorps radiomarqués dans un volume final de 50 μL . Après 1 heure à 4°C sous agitation douce, la radioactivité liée aux cellules est séparée de celle, liée aux anticorps libres à travers un mélange de 90% de dibutylphthalate (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) et de 10 % d'huile de paraffine (Merck, France) par centrifugation de 3 minutes à 12000 tours par minute. Après congélation des tubes dans l'azote, les tubes sont coupés pour séparer le culot de cellules du surnageant contenant les anticorps non fixés. La radioactivité présente dans les deux phases est mesurée au compteur γ (Wallac, Billerica, MA). La fixation non spécifique de l'anticorps marqué à l' ^{125}I est évaluée en présence d'un excès de 100 fois d'anticorps non marqué. Cette valeur est ensuite soustraite à la fixation spécifique de l'anticorps. Les résultats sont ensuite analysés à l'aide du logiciel Prism par une régression non linéaire de type "one binding site".

V. L'étude de biodistribution des anticorps B-B4, MJ7/18 et 7D4

Cette étude permet de suivre la distribution et la fixation des anticorps B-B4 et MJ7/18 radiomarqués à l' ^{125}I au sein des différents organes, sur des souris *nude* préalablement greffées avec la lignée MDA-MB-468. Les anticorps MJ7/18 et 7D4 ont été marqués selon le protocole suivi pour l'anticorps B-B4. 5×10^6 de cellules appartenant à la lignée MDA-MB-468 sont greffées aux souris *nude* en sous-cutanée, au niveau du flanc droit. Une dose de 4 MBq (108 μCi) de l'anticorps radiomarqué à l' ^{125}I et diluée dans une solution de sérum physiologique (0,2ml) a été administrée au niveau de la veine caudale latérale de la souris. Le prélèvement des organes est réalisé 6h, 24h, 48h, 72h et 96h après les différentes injections d'anticorps. Trois souris par point de prélèvement sont sacrifiées. La radioactivité de chaque

organe est ensuite mesurée au compteur γ (Wallac, Billerica, MA). Le pourcentage de la dose injectée par gramme (%ID/g) est ensuite calculée en fonction du poids de chaque organe.

B. Essais de RIT β et α *in vivo*

I. RIT β du cancer du sein

L'émetteur de particules β utilisé pour notre étude est l'iode 131 (^{131}I) (Perkin Elmer, Billerica, MA). La technique de fixation de ce radionucléide sur les anticorps, est identique à celle de l' ^{125}I , la méthode employée est dite à l'Iodo-Gen (cf. A.II.3). Cette technique présente l'avantage d'être facilement mise en œuvre en système clos, compte tenu de l'émission gamma de l' ^{131}I . Les activités spécifiques obtenues se situent entre 185 et 200 MBq/mg (5 et 5,4 mCi/mg). Le rendement de marquage est resté supérieur à 95%.

1. Le modèle animal

Les souris *nude* NMRI-nu (nu/nu) âgées de 8 à 10 semaines sont greffées en sous cutané au niveau du flanc droit, avec $5 \cdot 10^6$ de cellules MDA-MB-468, préalablement mises en suspension dans 0,1 ml de sérum physiologique. Une solution de Lugol à 0,1% est ajoutée à l'eau de consommation (0,1ml/100ml), quelques jours avant les tests de RIT, puis 2 semaines après l'injection du radioimmunoconjugué. Les souris sont traitées 24 jours après la greffe à l'aide de l'anticorps B-B4 couplé à l' ^{131}I , lorsque les tumeurs ont atteint un volume moyen de $84 \pm 21 \text{ mm}^3$.

2. Etude de doses

Cette étude a été réalisée à l'aide de l'anticorps B-B4 couplé à l' ^{131}I . Ce radioimmunoconjugué a été administré à 7 groupes de souris en intraveineux (IV) par la veine caudale. Le radioimmunoconjugué a été préalablement dilué dans 0,2 ml de sérum physiologique. Les différents groupes ont reçu 0 (n=4), 11,1 (300 μCi -n=4), 14,8 (400 μCi -n=4), 18,5 (500 μCi -n=4), 22,2 (600 μCi -n=4), 25,9 (700 μCi -n=4) et 37 MBq (1mCi-n=3) d'anticorps radiomarké. Une quantité constante de l'anticorps B-B4 a été administrée (120 μg).

3. Etude de toxicité

Parallèlement à l'étude de doses, les souris ont été pesées une fois par semaine pendant 96 jours. Un prélèvement de sang, réalisé au niveau de l'œil, est également recueilli à J0, J14, J28, J40, J55 et J90 après l'injection du radioimmunoconjugué. Le nombre de leucocytes et de plaquettes a été mesuré à l'aide d'un compteur de cellules automatisé (Melet-Scholoesing laboratoires Cergy-Pontoise- France).

4. L'essai de RIT β

Une étude complémentaire de RIT a été réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, en travaillant à la dose maximale tolérée (MTD-Maximum Tolerated Dose), soit 22,2MBq (600 μ Ci-n=4) et 14,8 MBq (400 μ Ci-n=4), une dose intermédiaire. Les résultats obtenus avec ces deux doses sont comparés avec ceux du groupe contrôle (n=5). Cette étude comparative permet d'évaluer un effet statistiquement significatif. Les volumes tumoraux ont été mesurés à l'aide d'un diamètre coulissant 2 fois par semaine pendant 96 jours, à partir de la longueur (L), de la largeur (l) et de l'épaisseur (e) de la tumeur. Le volume tumoral (V) a été calculé selon la formule suivante :

$$V = \pi/6 \times L \times l \times e$$

Les paramètres utilisés pour évaluer l'efficacité de chaque type de traitement sont le volume minimal relatif (rapport du plus petit volume tumoral observé sur le volume tumoral initial avant traitement) et le temps requis pour que la tumeur double son volume initial. La moyenne des volumes tumoraux a été calculée pour chaque groupe et chaque mesure. Par ailleurs, afin de classer les différentes réponses tumorales observées, nous avons préalablement définis trois stades de réponses thérapeutiques : la disparition totale de la tumeur sans récurrence jusqu'à la fin de l'étude (≥ 96 jours) ; les réponses complètes ou totales (RC) qui correspondent à la disparition de la tumeur pendant au moins 7 jours, mais avec récurrence ensuite ; et enfin les réponses partielles (PR), associées à une diminution du volume tumoral d'au moins 50% pendant 7 jours au minimum avec récurrence.

5. Immunohistochimie sur coupes de tissus de carcinome mammaire

L'immunomarquage est réalisé par une technique d'amplification streptavidine-biotine peroxydase standard (ChemMakeKit, Dako, Glostrup, Denmark). Les coupes de 4 μm d'épaisseur ont été réalisées à partir d'un prélèvement tissulaire de carcinome mammaire (lignée MDA-MB-468), à l'aide d'un "immunostainer" automatisé (Labvision, Fremont). Un anticorps primaire spécifique du syndecan-1 (le clone MI15, 1 :100, Dako) permet de mettre en évidence la présence du CD138 sur les coupes de tumeurs. L'anticorps secondaire biotinylé est ensuite appliqué pendant 30 minutes, puis, le complexe streptavidine-biotine peroxydase est déposé. L'activité peroxydase est révélée par l'ajout de 3,3-diamino-benzidine pendant 5 minutes. Les coupes sont contre-colorées par l'hématoxyline *Harris* (Merck, France) (incubation de 3 minutes). Pour les contrôles négatifs, la procédure d'immunomarquage est réalisée en omettant l'anticorps primaire. La lecture est faite avec un microscope optique au grossissement 400.

6. Les analyses statistiques

Différentes corrélations entre la dose et le degré de toxicité (perte de poids, taux plaquettaires et de leucocytes) ou avec l'efficacité du traitement (croissance tumorale) ont été établies en utilisant le test non paramétrique de Spearman, qui est une mesure du lien linéaire entre deux variables. Les groupes ayant reçu les différentes doses d'anticorps radiomarqué à l' ^{131}I ont été également comparées les unes aux autres par la méthode non-paramétrique ANOVA avec correction de Bonferroni. Les courbes de temps de dédoublement (le temps requis pour que les tumeurs atteignent deux fois leur volume initial) ont été obtenues selon la méthode de Kaplan-Meier, et comparé à l'aide du test de Logrank. Les analyses ont été conduites en utilisant le logiciel SAS version 9.1 (SAS institute, Cary, NC) et le logiciel STATA version 10.0 SE (StataCorp-College Station, Texas). La comparaison des volumes tumoraux moyens a été menée par un test non-paramétrique obtenu par l'institut de statistiques de Louvain (Belgique).

II. RIT α du cancer du sein

1. Radiomarquage des anticorps au ^{213}Bi

a. Réaction de couplage au CHX-A''-DTPA

Afin de pouvoir fixer un radionucléide métallique à un vecteur de nature protéique, il est nécessaire de coupler ce dernier à un agent chélatant bifonctionnel permettant de complexer, de façon stable le radioélément. L'agent complexant permettant de coupler le ^{213}Bi est le CHX-A''-DTPA (Macrocyclics, Dallas, USA). L'agent chélatant est repris par de l'acide chlorhydrique 0,4N afin d'obtenir une concentration finale de 15 $\mu\text{mol/ml}$. 10 équivalents (8,33 μL) de CHX-A''-DTPA sont ajoutés à 150 μL de la solution d'anticorps dilué dans un tampon de couplage. Ce tampon est constitué de 48mM de bicarbonate de soude, 2 mM de carbonate de sodium, 150 mM de chlorure de sodium et 5 mM d'EDTA pour complexer les métaux libres. Ce tampon est ajusté à pH 8,5, pour disposer des fonctions NH_2 sous forme libre et obtenir un rendement maximal de couplage. Une résine, la Chélex 100® (Sigma), est ajoutée au tampon de couplage de manière à complexer les traces de métaux libres. Le milieu réactionnel est incubé à température ambiante pendant 24h.

b. Purification des vecteurs couplés

Une étape de purification permet d'éliminer l'excès d'agent chélatant introduit lors de la réaction de couplage. La séparation de l'anticorps (plusieurs milliers de daltons) de l'agent chélatant libre (quelques centaines de daltons) repose sur la chromatographie en gel d'exclusion. Une technique de chromatographie d'exclusion sur gel de type PD10 est préférée à la technique de FPLC ("Fast Protein Liquid Chromatography"), bien que cette technique permette de séparer des agrégats protéiques, elle peut libérer dans le milieu des contaminants métalliques. Les colonnes Séphadex® PD10 (Amersham Biosciences, Orsay, France) sont conditionnées par un tampon acétate d'ammonium à 0,1 M et pH 5,6. L'élution est réalisée en tampon acétate de sodium. Les fractions d'intérêts sont déterminées par absorbance UV à 280 nm puis réunies. La concentration en anticorps obtenue, est mesurée par spectrométrie UV à 280 nm.

c. Calcul du nombre de ligands par vecteur

Pour déterminer le nombre d'agents complexants fixés par molécule de vecteur, un test de couplage à l'indium est réalisé. L'indium réagissant mole à mole avec l'agent complexant, une solution de molarité connue en indium est additionnée de traces radioactives d'indium radioactif, l' ^{111}In . Cette solution traçante nous permet, via la stœchiométrie de la réaction, de déterminer le nombre moyen de ligands par anticorps.

Une solution de chlorure d'indium à $9,53 \mu\text{mol/L}$ est préparée en dissolvant 32,1 mg de chlorure d'indium dans 15,2 mL d'acide chlorhydrique à $0,06 \text{ mol/L}$. A $10 \mu\text{L}$ de cette solution, est ajouté $10 \mu\text{L}$ d'une solution de chlorure d' ^{111}In émetteur de rayonnements gamma. La solution radioactive étant quantitativement à l'état de "trace", on peut considérer que la solution finale d'indium avec entraîneur est à $4,77 \mu\text{mol/mL}$.

Une quantité connue d'anticorps couplés préalablement avec le CHX-A"-DTPA est mise à incuber pendant 1h à 45°C avec 4 équivalents de la solution d'indium. Le rendement de marquage est déterminé par chromatographie sur couche mince de gel de silice (ITLC-SG). La migration est réalisée en tampon citrate pH 5,3 et révélée au Phosphor-Imager. Le nombre de ligands par vecteur est donné en multipliant le nombre d'équivalents en indium par le rendement de couplage. La détermination de ce nombre de ligands par vecteur nous permet d'estimer l'activité spécifique (rapport entre le nombre d'anticorps radiomarqués et le nombre d'anticorps non radiomarqués) de l'anticorps après radiomarquage.

d. Test d'immunoréactivité de l'anticorps B-B4 couplé au CHX-A"-DTPA

La fixation du CHX-A"-DTPA sur l'anticorps peut dans certains cas modifier son affinité pour la cible. Nous avons donc évalué l'immunoréactivité de l'anticorps B-B4 couplé au CHX-A"-DTPA par une étude comparative du marquage de l'anticorps natif et radiomarqué sur la lignée MDA-MB-468, par un test de cytométrie en flux.

La lignée cellulaire MDA-MB-468 utilisée pour ce test a été cultivée dans les conditions précisées dans le paragraphe A.I. Trois jours avant le marquage, les cellules MDA-

MB-468 sontensemencées à 5×10^4 cellules par mL et incubées à 37°C. $1,5 \cdot 10^5$ cellules sont utilisées pour chaque point expérimental. Les cellules sont lavées une fois avec du milieu RPMI-SVF 10% et incubées 1h à 4°C dans un milieu contenant une gamme de concentration de l'anticorps B-B4 natif ou radiomarqué. La gamme de concentration est comprise entre 10 µg/mL et 9,7 ng/mL, à partir d'une gamme de dilution réalisée au demi. Après 3 lavages en PBS/BSA 0,1%, les cellules sont incubées 1h à 4°C avec 10 µg/mL d'anticorps de lapin anti-IgG de souris couplé à la fluorescéine (FITC). Après une nouvelle série de 3 lavages en PBS/BSA 0,1%, les cellules sont remises en suspension dans 200 µL de PBS 1X froid et analysées au cytomètre en flux FACSarray (Becton Dickinson, Le Pont en Claix, France).

e. Radiomarquage des anticorps au ^{213}Bi

Le ^{213}Bi est produit par la décroissance de l' ^{225}Ac . Les générateurs d' ^{225}Ac nous sont fournis par l'Institut des TransUranien (ITU, Karlsruhe, Allemagne). L' ^{225}Ac est fixé sur une résine AGMP-50 et ce générateur peut être utilisé pendant environ deux semaines après réception selon son chargement. Le bismuth est élué de la colonne avec 1 mL d'une solution contenant 0,1 M d'HCl et 0,1 M de NaI. Cette technique permet d'obtenir des rendements d'élution de 60 à 80 %.

Le radiomarquage des isotopes de nature métallique requiert des conditions acides, afin d'éviter la précipitation par hydrolyse des métaux. Les différentes solutions d'élution obtenues sont neutralisées par ajout de soude et tamponnées par un tampon citrate/acétate pH 5,6. Le rendement du radiomarquage est calculé par chromatographie sur couche mince de gel de silice (ITLC-SG) en tampon citrate pH 5,3 puis compté au scintillateur solide.

Une colonne de purification Séphadex® PD10 (Amersham) est conditionnée puis éluee, après dépôt du mélange réactionnel, par une solution de "sérum bovine albumine" (BSA-0,25g) dilué dans 50 mL de tampon phosphate 0,1M à pH 7,2. Les différentes fractions sont collectées et mesurées au débit-mètres. Les fractions d'intérêt sont réunies et la pureté radiochimique est contrôlée par chromatographie sur couche mince de gel de silice (ITLC-SG), la migration est effectuée en tampon citrate à pH 5,3. La pureté radiochimique est calculée par ITLC-SG. La plaque de gel de silice est découpée à mi-hauteur de migration et les deux parties sont mesurées à l'aide du compteur à cristal de NaI(Tl).

Une quantité prédéfinie d'anticorps couplés CHX-A"-DTPA est incubée pendant 15 minutes à 37°C dans une solution tampon contenant le ^{213}Bi fraîchement élué avec du PBS

(pH 7,4) par fraction de 0,5 mL. Les fractions ayant les plus fortes activités au compteur γ sont regroupées et l'activité est calculée en Bq/mg d'anticorps. L'anticorps radiomarqué est alors filtré sur 0,22 μ m.

2. Les essais *in vivo*

a. Le modèle animal

Les souris *nude* âgées de 6 à 8 semaines ont été préalablement greffées au niveau du flanc droit, en sous-cutané, avec 5×10^6 cellules appartenant à la lignée MDA-MB-468. L'injection des différents anticorps B-B4, 7D4, MJ7/18 ou OKT3 ont été réalisés 25 jours après l'inoculation des cellules cancéreuses pour les essais évaluant l'efficacité du ^{213}Bi , et 36 jours après la greffe pour l'essai évaluant le potentiel thérapeutique de l'anticorps MJ7/18 couplé à l' ^{211}At .

b. Etude de toxicité

Les souris ont été pesées parallèlement à la mesure des volumes tumoraux, permettant d'évaluer la perte pondérale après administration des différents radioimmunoconjugués. Un prélèvement de sang, réalisé au niveau de l'œil, a été également recueilli une fois par semaine (B-B4/ ^{213}Bi et 7D4/ ^{213}Bi) ou toutes les deux semaines (MJ7/18/ ^{211}At) après l'injection du radioimmunoconjugué. Le nombre de leucocytes, de plaquettes et de globules rouges a été mesuré à l'aide d'un compteur de cellules automatisé (Melet-Scholoesing laboratoires Cergy-Pontoise- France).

3. Essais de RIT α utilisant le ^{213}Bi

a. Evaluation de la toxicité du B-B4/ ^{213}Bi

Les doses toxiques et thérapeutiques ont été déterminées à partir de plusieurs essais de RIT étudiant l'efficacité du B-B4/ ^{213}Bi . Les doses administrées ont été les suivantes : 0 (n=7)

- 3,7 MBq (100 μ Ci-n=9), 7,4 MBq (200 μ Ci-n=4), 8,51 MBq (230 μ Ci-n=5), 11,1 MBq (300 μ Ci-n=4), 12,95 MBq (350 μ Ci-n=4) et 18,5 MBq (500 μ Ci-n=5). La dose maximale tolérée est basée sur l'absence de décès et de perte de poids supérieure à 10% durant l'étude. La dose létale 50 (DL50) correspond à la dose responsable de la mort de 50% des animaux traités durant l'étude. L'évaluation de la DMT et la DL50 a été réalisée sur 75 jours.

b. Evaluation de la spécificité du ciblage du B-B4 couplé au ^{213}Bi

Cette étude a été réalisée à l'aide des anticorps B-B4 et OKT3, couplés au ^{213}Bi . Les doses testées ont été les suivantes : 0 (n=4) ; 3,7 MBq (n=3) ; 7,4 et 11,1 MBq (n=3). Le suivi du volume tumoral de chaque animal traité a été réalisé une fois par semaine pendant 75 jours.

c. Ciblage de l'endothélium vasculaire utilisant l'anticorps MJ7/18 couplé au ^{213}Bi

L'anticorps MJ7/18 couplé au ^{213}Bi a permis d'étudier l'efficacité du ciblage de l'endothélium vasculaire en RIT α . Les doses suivantes ont été injectées : 0 (n=7) - 3,7 MBq (100 μ Ci-n=5) - 7,4 MBq (200 μ Ci-n=5) et 11,1 MBq (300 μ Ci-n=4). Une étude comparative a été réalisée avec les mêmes doses de radioconjugués B-B4/ ^{213}Bi et OKT3/ ^{213}Bi . Le suivi a été réalisé sur 75 jours.

4. Ciblage de l'endothélium vasculaire à l'aide de l'anticorps MJ7/18 couplé à l' ^{211}At

a. Radiomarquage de l'anticorps MJ7/18 à l' ^{211}At

- Extraction de l' ^{211}At**

La cible est déposée dans un bécher de 100 mL et 500 μ L d'acide nitrique 65 % sont déposés au centre de la cible. Après 10 minutes de réaction durant lesquelles on observe un abondant dégagement de vapeur nitreuse de couleur marron, l'acide nitrique est prélevé puis mis à évaporer à sec dans un tube à hémolyse placé dans un bloc chauffant (150°C).

L'opération est pratiquée à 6 reprises. Après chaque attaque acide de la cible, la fraction nitrée est ajoutée au résidu sec de la précédente attaque. Après évaporation à sec des 4 fractions acides, le résidu est repris par 3 mL d'acide nitrique commercial 65% dilué au demi (32,5 %). Ces 3 mL d'acide nitrique 32,5 % contenant l'astate-211 sont extraits par 2 fois 500 μ L de di-isopropylether.

- **Marquage de l'anticorps**

Le marquage est réalisé comme suit : à 80 nmol de précurseur stannique (ester 3-(triméthylstannyl)benzoate de N-hydroxysuccinimidyle) est ajouté 400 μ L d'astate en phase di-isopropylether (30 à 40 MBq) en présence de 400 nmol de N-chlorosuccinimide (20 μ L) à 30 minutes de réaction à température ambiante,

Après marquage et afin d'éliminer l'acide nitrique, le di-isopropylether est évaporé pendant 20 minutes par chauffage au bloc chauffant à 40°C sous flux d'azote. Le résidu sec est repris par 200 μ L d'un mélange méthanol/acide acétique 95 :5 est mis à compter dans une chambre d'ionisation non calibrée pour l'²¹¹At de type ACAD 2000 de la société Lemer Pax (Carquefou – France). Cette solution est déposée sur une colonne SepPak C18 fournie par la société Waters (Milford, Massachusetts – Etats-Unis) préalablement reconditionnée par passage de 5 mL d'un mélange eau/acide trifluoroacétique 0,1%, 5 mL d'acétonitrile et enfin 5 mL d'un mélange eau/acide trifluoroacétique 0,1%.

Après dépôt des 200 μ L, la colonne SepPak C18 est éluée par 2 mL d'un mélange eau/acide trifluoroacétique 0,1% puis par 2 mL d'acétonitrile. Les fractions aqueuses et organiques sont comptées dans une chambre d'ionisation puis la phase organique est mise à évaporer pendant 35 minutes par chauffage au bloc chauffant à 40°C sous flux d'azote.

300 μ L de l'anticorps MJ7/18 reconditionnés en tampon carbonate 300 mM pH = 8,5 sont déposés sur le résidu sec préalablement obtenu. La réaction se déroule à 37°C pendant 15 minutes. Le rendement de couplage est déterminé par CCM sur ITLC-SG élué par de l'acide trichloracétique 10%. Après migration, la CCM est coupée au centre et chaque partie est comptée au gamma spectromètre NaI(Tl) de la société Raytest (Straubenhardt - Allemagne). L'anticorps radiomarké est ensuite purifié par passage sur colonne de chromatographie d'exclusion sur gel Sephadex® de type NAP-5 de la société Amersham-Bioscience GE Healthcare (Uppsala - Suède). La colonne est préalablement reconditionnée par 5 mL de tampon phosphate 0,1 M (pH = 7,2). L'ensemble du volume de la solution d'anticorps

radiomarqué est déposé sur la colonne et cette dernière est éluée par fraction de 200 μ L de tampon phosphate. Les fractions d'élutions sont collectées et comptées sur gamma spectromètre NaI(Tl) de la société Raytest (Straubenhardt, Allemagne). Les fractions d'intérêt sont réunies dans un tube à hémolyse préalablement taré afin de permettre une détermination du volume collecté par pesée. La pureté radiochimique du produit ainsi purifié est mesurée par CCM sur ITLC-SG élué par de l'acide trichloracétique 10%. Après migration, la CCM est coupée au centre et chaque partie est comptée au gamma spectromètre NaI(Tl).

b. Essai de RIT α utilisant l'anticorps MJ7/18 couplé à l' ^{211}At

L'étude a été conduite sur la souris *nude* préalablement greffées avec la lignée MDA-MB-468 (cf. II.1). Une première dose de 10 μ Ci a été injectée (Jo) puis une deuxième 57 jours après le début de traitement, plus élevée de 18 μ Ci (n=3). Un suivi d'un groupe non traité (n=4) nous a permis d'évaluer l'efficacité du radioimmunoconjugué. Le suivi a été réalisé sur 100 jours.

DISCUSSION

Partie I : RIT β du carcinome mammaire

Durant mon travail de thèse, nous avons mis en place un essai de RIT β utilisant l'anticorps B-B4 couplé à l' ^{131}I , dans un modèle de carcinome mammaire. Il s'agit de la première étude évaluant le potentiel thérapeutique de l'anticorps B-B4, spécifique du syndecan-1, dans le cadre du traitement de cette pathologie. Le syndecan-1 est un antigène exprimé sur des tumeurs d'origine histologique variées, dont le carcinome mammaire, prostatique, pulmonaire ou le myélome multiple (Wijdenes, Vooijs et al. 1996; Yip, Smollich et al. 2006). Il permet donc d'envisager le ciblage de différentes pathologies à l'aide de l'anticorps B-B4, couplé à un radioélément β .

Nous avons obtenu une réponse significative dépendante de la dose administrée, sur une lignée exprimant faiblement le syndecan-1. Le ciblage est donc efficace pour de faibles densités antigéniques lorsque le ciblage est effectué à l'aide d'un anticorps complet. La dose de 14,8 MBq (400 μCi) a permis de ralentir le temps de doublement du volume tumoral de 58 jours (± 17), par rapport au groupe témoin pour lequel ce délai est de 28 jours (± 13). La Dose Maximale tolérée (DMT) a été fixée à 22,2 MBq (600 μCi), dans notre étude le temps de doublement n'a pu être déterminé pour cette dose, puisque le volume tumoral n'a pas doublé pour plus de la moitié des souris durant le temps de l'étude. La DMT que nous avons déterminée se situe entre une plus faible valeur de 7,4 MBq (200 μCi), rapportée dans une étude menée chez la souris, avec un anticorps entier dirigé contre l'antigène LeY couplé à l' ^{131}I (Clarke, Lee et al. 2000), et une valeur de 40,5 MBq (1,09 mCi) déterminée par le groupe de Peterson, (Peterson, Blank et al. 1997), avec l'anticorps entier Mc5 couplé à l' ^{131}I . Les résultats obtenus sont très encourageants avec plus de 60% de réponses complètes, et disparition totale de la tumeur chez 37,5% des animaux traités dans le groupe ayant reçu la DMT et pour un suivi réalisé sur plus de 3 mois.

L'efficacité du traitement est évidente avec une toxicité acceptable. En effet, la chute des lignées leucocytaires et plaquettaire reste transitoire, pour les groupes traités, même aux plus fortes doses. La lignée érythrocytaire ne semble pas être atteinte, aucun accident hémorragique n'a été constaté. L'étude de biodistribution de l'anticorps 7D4, non spécifique du syndecan-1, et de même isotype que l'anticorps B-B4, nous permet de valider l'accumulation de l'anticorps B-B4 par fixation spécifique de l'anticorps sur le syndecan-1 des cellules tumorales. Cette comparaison nous permet également d'affirmer que l'anticorps B-B4 ne se fixe pas aux organes sains de façon spécifique. Ces résultats étaient attendus puisque le

B-B4 ne reconnaît pas le syndecan-1 murin. Une étude plus approfondie de la biodistribution de l'anticorps B-B4 chez l'homme, à l'occasion de l'essai clinique de phase I/II de RIT β du myélome multiple, nous permettra d'évaluer une fixation spécifique de cet anticorps aux organes sains. Elle nous permettra également d'évaluer la fenêtre de doses thérapeutiques pour un essai de RIT β du cancer du sein à l'aide de l'anticorps B-B4 chez l'homme.

Cette étude nous a aussi permis de constater que la fixation spécifique de l'anticorps B-B4 est détectable seulement 24h après l'injection du radioimmunoconjugué. L'administration de l'anticorps B-B4 sous la forme d'une IgG totale peut expliquer cette lente cinétique d'accumulation. En revanche le maintien d'une concentration élevée d'anticorps radiomarké dans la circulation sanguine peut présenter un avantage pour atteindre des cibles antigéniques peu exprimées comme dans le cadre du ciblage de la lignée MDA-MB-468, constituant notre modèle d'étude. On observe en effet une accumulation de l'anticorps encore 96h après injection du radioimmunoconjugué, avec des concentrations d'anticorps comparables dans le sang et la tumeur. L'utilisation d'anticorps complet pose néanmoins des problèmes spécifiques de toxicité. La demi-vie biologique des anticorps peut en effet exposer parfois les organes sains aux rayonnements, comme la moelle osseuse qui est particulièrement radiosensible, et constitue le facteur limitant prédominant des protocoles de radioimmunothérapie (Cassidy, Newell et al. 1993; Knox 1995). De nombreuses études ont évalué le potentiel thérapeutique des fragments d'anticorps couplé à des rayonnements ionisants (Milenic, Yokota et al. 1991; Yokota, Milenic et al. 1992). Le temps de résidence des fragments d'anticorps est limité et la dégradation du radioimmunoconjugué est très rapide. Ceci conduit à limiter la toxicité hématologique, mais entraîne une toxicité importante des produits de catabolisme au niveau du rein. Un compromis doit être trouvé entre le choix du vecteur (IgG totale ou fragments d'anticorps) et le radionucléide. Dans le cadre de notre étude, la demi-vie physique (8 jours) de l' ^{131}I semble être adaptée à la cinétique de distribution de l'anticorps B-B4, qui reste fixée au niveau de la tumeur au moins jusqu'à la fin de notre étude (96h) avec une toxicité hématologique qui reste transitoire et modérée.

Partie II : RIT α du carcinome mammaire

Nous avons envisagé d'étudier l'efficacité du B-B4 couplé au ^{213}Bi dans le modèle de carcinome mammaire afin de déterminer une dose thérapeutique et évaluer la toxicité aigue de ce type d'association. Il nous a également permis de comparer l'efficacité de rayonnements β et α dans un même modèle de ciblage du syndecan-1.

A. Ciblage du syndecan-1

Nous avons montré l'efficacité du ciblage du syndecan-1 en RIT α à l'aide du ^{213}Bi . Nous avons ainsi déterminé une dose maximale tolérée (11,1 MBq ou 300 μCi) soit 370 MBq/kg et une dose létale 50 évaluée à 12,95 MBq (350 μCi) soit 431,7 MBq/kg. Ces doses devront cependant être confirmées par une étude avec un suivi réalisé sur une plus longue période. Une étude évaluant la toxicité du PAI2 couplé au ^{213}Bi , a permis de constater en effet une diminution de la DMT lorsque le suivi passait de 13 semaines, avec une DMT estimée à 1420 MBq/kg (Abbas Rizvi, Li et al. 2006) à 30 semaines avec une DMT fixée à 350 MBq/Kg (Song, Abbas Rizvi et al. 2007).

Un effet est observé dès les premières activités (3,7 MBq soit 100 μCi), avec une inflexion plus marquée aux plus fortes activités 20 jours après l'administration du radioimmunoconjugué. Nous avons montré à l'aide d'un anticorps non spécifique du syndecan-1 (OKT3), que cet effet était indépendant de la spécificité de l'anticorps administré et résultait donc de l'irradiation non spécifique de la tumeur. Cet effet non spécifique est probablement lié à la forte accumulation d'anticorps à la tumeur aux temps précoces. Les pourcentages de dose injectée par gramme de tumeur à 4h sont identiques pour les anticorps spécifiques et non spécifiques et atteignent des taux élevés comparativement aux organes sains. Comme nous l'avons précédemment évoqué, une fixation spécifique n'est détectable que pour des temps plus long alors que la totalité du ^{213}Bi a déjà décru (le ^{213}Bi a perdu plus de 95% de son énergie au bout de 4h). Bien que les résultats obtenus soient particulièrement encourageants, aucune rémission complète n'a été observée. En effet, l'administration du radioimmunoconjugué n'a pas permis de détruire la tumeur totalement, sur une durée supérieure à 7 jours. Contrairement aux rayonnements β , l'atteinte au niveau des lignées plaquettaire et leucocytaire est observée une semaine seulement après l'injection du

radioimmunoconjugué, mais reste transitoire. Les niveaux sont restaurés 2 à 3 semaines après le *nadir*. Par ailleurs, aux activités où une régression tumorale est observée, la toxicité hématologique reste importante. L'atteinte érythrocytaire est plus tardive et propre aux rayonnements α . Les signes extérieurs, comme les pétéchies sur le dos des animaux traités, souligne une atteinte de la vascularisation de l'animal. Nous pouvons supposé que les rayonnements administrés atteignent les vaisseaux de l'animal, et que l'effet non spécifique de l'irradiation sur la réponse tumorale est en partie la conséquence de l'atteinte de la vascularisation. Ces éléments nous ont permis d'envisager le ciblage de la néo-vascularisation tumorale, plus rapidement accessible que les tissus tumoraux, afin de prendre en compte la courte demi-vie du ^{213}Bi , qui suppose d'atteindre rapidement la cible antigénique.

B. Ciblage de la néo-vascularisation tumorale

Développée depuis plus de 20 ans, la RIT a prouvé son efficacité en hématologie dans le traitement du lymphome B, mais reste à démontrer dans le traitement des tumeurs solides radorésistantes. Dans ce cadre, le ciblage de la néo-vascularisation tumorale constitue une approche intéressante permettant de développer le potentiel thérapeutique de la RIT dans le traitement de ce type de tumeur. Le ciblage d'un constituant du réseau vasculaire tumoral, associé à l'efficacité des rayonnements ionisants, va permettre de prévenir la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, limitant ainsi le croissance tumorale en amont. Cette approche permet de s'affranchir de trois problèmes rencontrés au cours des thérapies classiques : la résistance aux chimiothérapie classique (Kerbel 1991; Boehm, Folkman et al. 1997), le problème de biodistribution tumorale (Dvorak, Nagy et al. 1991), et l'hétérogénéité tumorale (Takahashi, Haba et al. 2001). L'endoglin présent au niveau des cellules endothéliales activées des vaisseaux sanguins de l'espace péri- et intra-tumoral constitue une cible potentielle. Le développement d'un seul anticorps spécifique de l'espace vasculaire tumoral va permettre de traiter un grand nombre de tumeurs solides. Le fort potentiel toxique des particules alpha est adapté au ciblage des cellules endothéliales pour trois raisons principales. Tout d'abord il n'est pas nécessaire d'avoir une accumulation importante d'anticorps radiomarké à la surface de la cellule ciblée pour la tuer contrairement aux émetteurs β où l'effet de "feux croisés" des émissions est requis pour obtenir une toxicité cellulaire. D'autre part, la localisation des cellules endothéliales sur les vaisseaux sanguins permet d'envisager une fixation rapide de l'anticorps à forte concentration dans le sang, durant les premières

heures qui suivent l'injection du radiopharmaceutique. Enfin la fixation du radioélément sur les cellules endothéliales devrait permettre d'obtenir une irradiation des cellules tumorales péri-vasculaires. Une première étude réalisée par l'équipe de Tabata a prouvé l'intérêt de cette nouvelle cible antigénique en associant un anticorps dirigé contre le CD105 couplé à l' ^{125}I , émetteur d'électrons Auger possédant un fort TEL, dans un modèle de xénogreffe de carcinome mammaire (Tabata, Kondo et al. 1999).

Nous avons ainsi réalisé le ciblage de la néo-vascularisation tumorale à l'aide de l'anticorps MJ7/18 spécifique de l'endoglin (CD105), un marqueur de mauvais pronostic dans de nombreux types de cancers. Il participe à la régulation de l'endothélium vasculaire et est surexprimé par les cellules endothéliales activées de l'environnement tumoral (Dallas, Samuel et al. 2008). Le CD105 exprimé dans de nombreux types de tumeurs solides telles que le cancer gastro-intestinal, le carcinome mammaire, de la prostate ou les adénomes oesophagiens est associée à la présence de métastases (Li, Guo et al. 2000; Saad, El-Gohary et al. 2005; Ding, Li et al. 2006; Yang, Lu et al. 2006; El-Gohary, Silverman et al. 2007). Facilement et rapidement accessible il permet un ciblage de l'endothélium vasculaire efficace. Il permet d'optimiser l'utilisation du ^{213}Bi , dont la demi-vie (45,6 min) est relativement courte par rapport aux autres particules alpha.

Dans notre étude de biodistribution de l'anticorps MJ7/18, la fixation au niveau pulmonaire constitue un facteur limitant majeur. En effet, la fixation est supérieure à 40% de la dose administrée, 6h après l'injection du radioimmunoconjugué pour décroître ensuite rapidement. L'écart-type est relativement important, et souligne l'hétérogénéité du lot. Il est démontré que l'endoglin est exprimé par les macrophages activés et les fibroblastes stromaux extraits du poumon (Lastres, Bellon et al. 1992). Il est possible que l'hétérogénéité de distribution d'un animal à l'autre soit liée à une infection du tissu pulmonaire des souris, lors de l'injection du radioimmunoconjugué. Cette hypothèse doit être confirmée en réévaluant la biodistribution sur des animaux contrôlés d'un point de vue sanitaire. Un suivi à long terme des souris ainsi qu'une étude histologique du tissu pulmonaire après la RIT sont envisagés pour évaluer la toxicité au niveau de cet organe.

Le ciblage du marqueur CD105 en RIT α utilisant le ^{213}Bi , nous a permis d'obtenir une limitation de la croissance tumorale après administration de 3,7 MBq. A cette dose, l'effet obtenu avec l'anticorps MJ7/18 est supérieur à celui observé avec un anticorps spécifique ou non spécifique de la tumeur. Nous n'avons pas observé d'effets indésirables sur les souris traitées par l'anticorps MJ7/18 marqué au ^{213}Bi ou à l' ^{211}At susceptible d'évoquer une atteinte

pulmonaire aux doses utilisées. La possibilité d'obtenir une réponse tumorale pour de faibles doses de radiopharmaceutiques avec une toxicité hématologique très limitée permet d'envisager la combinaison du ciblage vasculaire en RIT alpha à d'autres approches thérapeutiques. La pureté de l'anticorps utilisé était loin d'être optimale essentiellement en raison de la contamination par les Ig de veau contenus dans le milieu de culture des hybridomes. Après avoir mis au point les conditions de production dans un milieu appauvri en sérum de veau fœtal, nous sommes actuellement en mesure de réitérer les essais de RIT avec un immunoconjugué de bonne qualité.

Actuellement, le ^{213}Bi demeure le radioélément émetteur alpha le plus aisément disponible, mais sa production dans quelques sites dans le monde (Karlsruhe, Allemagne et Oak-Ridge, Etats-Unis) limite le nombre de patients pouvant être potentiellement traités. De plus, les activités produites sont actuellement insuffisantes pour permettre de délivrer des doses thérapeutiques au patient. L' ^{211}At constitue une alternative intéressante au ^{213}Bi , compte tenu de sa période plus longue.

L'utilisation de l' ^{211}At est actuellement envisagée au sein de notre équipe, compte tenu de l'arrivée du cyclotron ARRONAX à Nantes. Pour l'instant, ce radioélément nous est fourni par le cyclotron d'Orléans (CERI). Comparé au ^{213}Bi , l' ^{211}At permet, à activité spécifique équivalente, de marquer 20 fois plus d'anticorps, ce qui donne la possibilité d'améliorer le ciblage à l'aide de l'anticorps MJ7/18. Nous avons ainsi démontré l'efficacité de l' ^{211}At , en fractionnant la dose administrée, limitant ainsi la toxicité aux tissus sains. Nous envisageons de développer cette étude sur de plus grands lots de souris, en évaluant une escalade de doses, nous permettant à court terme de définir la dose maximale tolérée, et les effets toxiques associés.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats présentés dans ce travail de thèse ont montré le potentiel thérapeutique des émetteurs de particules β et α dans le traitement de petites masses tumorales, dans un modèle de carcinome mammaire. Nous avons obtenu la régression du volume tumoral des animaux traités à la DMT et ayant reçu l'anticorps B-B4 couplé à l' ^{131}I . L'approche par RIT α utilisant le ^{213}Bi est limitée par la demi-vie de l'isotope. L'étude préliminaire du ciblage de l'endothélium vasculaire à l'aide de l'anticorps MJ7/18 couplé au ^{213}Bi est prometteuse, mais doit être intégrée dans une approche de thérapies associées. Le traitement des formes métastatiques requiert en effet généralement l'association de plusieurs traitements. La RIT délivre en effet des doses d'irradiation aux masses tumorales suffisantes pour pouvoir induire la régression de la tumeur, mais ne permet pas d'obtenir une régression totale du volume tumoral. Les thérapies associées présentent un intérêt majeur d'un point de vue toxique et thérapeutique. Plusieurs associations sont actuellement discutées : l'association de plusieurs anticorps et de plusieurs radionucléides, ou l'association de différentes modalités d'administration. Ces différentes combinaisons vont permettre de diminuer les phénomènes de résistance et de rendre plus tolérable les traitements.

La RIT utilisant l' ^{131}I constitue également un candidat idéal pour une association avec des agents de chimiothérapie radiosensibilisant tel que le paclitaxel (Kraeber-Bodere, Sai-Maurel et al. 2002; Kelly, Lee et al. 2006). Ces molécules vont permettre de placer les cellules en phase G2/M du cycle cellulaire. Il est démontré que ce stade est plus radiosensible (Press and Rasey 2000). Nous pourrions donc associer le ciblage du syndecan-1 en RIT β à l'administration du paclitaxel. Il reste à définir le moment idéal de l'administration de ce traitement sachant que la majorité des études démontre une efficacité de l'association, lorsque le paclitaxel est administré après la RIT (DeNardo, Kukis et al. 1997; Clarke, Lee et al. 2000).

Il est possible également d'améliorer le traitement, en envisageant une réinjection du radionucléide, afin de prévenir la reprise de la croissance tumorale, pour neutraliser les cellules résiduelles, afin d'être en mesure d'éviter toutes récives. Cependant la réinjection du radioimmunoconjugué peut être limitée par la production d'anticorps humain dirigés contre les Ig administrées. La production d'une forme humanisée de l'anticorps B-B4 permettrait de diminuer cette réponse.

Par ailleurs, il est démontré que les traitements anti-angiogéniques permettent d'augmenter la biodistribution des anticorps en augmentant la perméabilité vasculaire et en diminuant le flux interstitiel (Tong, Boucher et al. 2004; Winkler, Kozin et al. 2004; Jain, Chauhan et al. 2005). La thérapie anti-angiogénique pourrait également permettre de

prolonger l'état quiescent de métastases microscopiques (Kinuya, Kawashima et al. 2001). Nous pourrions donc envisager l'association du ciblage de l'endothélium vasculaire à l'aide de l'anticorps MJ7/18 couplé au ^{213}Bi ou à l' ^{211}At , au ciblage du syndecan-1 couplé à l' ^{131}I . Les rayonnements α seront adaptés au ciblage du compartiment vasculaire, restreint à la lumière du vaisseau. Les rayonnements β permettront d'assurer un transfert d'énergie homogène au sein de la tumeur, par un effet de "feux croisés". L' ^{90}Y constitue une alternative à l' ^{131}I , en tant que radioélément β pur. Cependant, compte tenu de la distance parcourue par son rayonnement (moyenne 5,3 mm), il peut délivrer des rayonnements en dehors d'une masse tumorale ciblée inférieure à 2 ou 3 mm, générant une toxicité non négligeable au niveau des tissus sains adjacents mais présente un intérêt pour le ciblage de masses tumorales plus importantes. Le choix du radioélément doit donc être adapté à chaque type de tumeur ainsi qu'à chaque stratégie de ciblage.

Les difficultés techniques de manipulation et de radioprotection des radioisotopes limitent aujourd'hui le développement des protocoles de radioimmunothérapie en clinique. Actuellement les installations susceptibles de recevoir ce type d'expérimentations demeurent peu nombreuses en raison des contraintes légales s'y attachant. Les problèmes de radioprotection peuvent constituer également un facteur limitant les études cliniques de plus grande ampleur. Ces différentes contraintes ne doivent cependant pas masquer l'intérêt potentiel de la radioimmunothérapie, se plaçant progressivement en première ligne thérapeutique en consolidation après un traitement par chimiothérapie-immunothérapie ou dans le cadre de protocoles myéloablatifs.

Références bibliographiques

- Aarts, F., R. P. Bleichrodt, et al.** (2008). "Intracavitary radioimmunotherapy to treat solid tumors." Cancer Biother Radiopharm **23**(1): 92-107.
- Abbas Rizvi, S. M., Y. Li, et al.** (2006). "Preclinical studies of bismuth-213 labeled plasminogen activator inhibitor type 2 (PAI2) in a prostate cancer nude mouse xenograft model." Cancer Biol Ther **5**(4): 386-93.
- Adam, P. J., G. J. Clesham, et al.** (1998). "Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells." Biochem Biophys Res Commun **247**(1): 33-7.
- Allen, B. J. and N. Blagojevic** (1996). "Alpha- and beta-emitting radiolanthanides in targeted cancer therapy: the potential role of terbium-149." Nucl Med Commun **17**(1): 40-7.
- Allen, B. J., C. Raja, et al.** (2005). "Intralesional targeted alpha therapy for metastatic melanoma." Cancer Biol Ther **4**(12): 1318-24.
- Alvarez, R. D., W. K. Huh, et al.** (2002). "A Phase I study of combined modality (90)Yttrium-CC49 intraperitoneal radioimmunotherapy for ovarian cancer." Clin Cancer Res **8**(9): 2806-11.
- Anderson, H., J. Elgqvist, et al.** (2003). "Astatine-211-labeled Antibodies for Treatment of Disseminated Ovarian Cancer. An Overview of Results in an Ovarian Tumor Model." Clin Cancer Res **9**: 3914s.
- Anderson, H. and S. Palm** (2001). "Comparison of the therapeutic efficacy of 211At- and 131I-labelled monoclonal antibody MOv18 in nude mice with intraperitoneal growth of human ovarian cancer." Anticancer Res. **21**(1A): 409-12.
- Apostolidis, C., R. Molinet, et al.** (2005). "Production of Ac-225 from Th-229 for targeted alpha therapy." Anal Chem **77**(19): 6288-91.
- Arthur, H. M., J. Ure, et al.** (2000). "Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development." Dev Biol **217**(1): 42-53.
- Baba, F., K. Swartz, et al.** (2006). "Syndecan-1 and syndecan-4 are overexpressed in an estrogen receptor-negative, highly proliferative breast carcinoma subtype." Breast Cancer Res Treat **98**(1): 91-8.
- Bamias, A., M. J. Bowles, et al.** (1993). "Intravesical administration of indium-111-labelled HMFG2 monoclonal antibody in superficial bladder carcinomas." Int J Cancer **54**(6): 899-903.
- Barbara, N. P., J. L. Wrana, et al.** (1999). "Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily." J Biol Chem. **274**(2): 584-94.

- Barbareschi, M.**, P. Maisonneuve, et al. (2003). "High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis." Cancer **98**(3): 474-83.
- Barbet, J.**, F. Kraeber-Bodere, et al. (1999). "Pretargeting with the affinity enhancement system for radioimmunotherapy." Cancer Biother Radiopharm **14**(3): 153-66.
- Bardies, M.**, P. Thedrez, et al. (1992). "Use of multi-cell spheroids of ovarian carcinoma as an intraperitoneal radio-immunotherapy model: uptake, retention kinetics and dosimetric evaluation." Int J Cancer **50**(6): 984-91.
- Bass, L. A.**, M. Wang, et al. (2000). "In vivo transchelation of copper-64 from TETA-octreotide to superoxide dismutase in rat liver." Bioconjug Chem **11**(4): 527-32.
- Behr, T. M.**, T. Liersch, et al. (2002). "Radioimmunotherapy of small-volume disease of metastatic colorectal cancer." Cancer **94**(4 Suppl): 1373-81.
- Behr, T. M.**, M. Behe, et al. (1999). "High-linear energy transfer (LET) alpha versus low-LET beta emitters in radioimmunotherapy of solid tumors: therapeutic efficacy and dose-limiting toxicity of ²¹³Bi- versus ⁹⁰Y-labeled CO17-1A Fab' fragments in a human colonic cancer model." Cancer Res **59**(11): 2635-43.
- Behr, T. M.**, S. Memtsoudis, et al. (1999). "Radioimmunotherapy of colorectal cancer in small volume disease and in an adjuvant setting: preclinical evaluation in comparison to equitoxic chemotherapy and initial results of an ongoing phase-I/II clinical trial." Anticancer Res **19**(4A): 2427-32.
- Behr, T. M. and R. M. Sharkey** (1997). "Phase I/II clinical radioimmunotherapy with an iodine-131-labeled anti-carcinoembryonic antigen murine monoclonal antibody IgG." J Nucl Med **38**(6).
- Behr, T. M.**, R. M. Sharkey, et al. (1995). "Reduction of the renal uptake of radiolabeled monoclonal antibody fragments by cationic amino acids and their derivatives." Cancer Res **55**(17): 3825-34.
- Behr, T. M.**, R. M. Sharkey, et al. (1997). "Overcoming the nephrotoxicity of radiometal-labeled immunoconjugates: improved cancer therapy administered to a nude mouse model in relation to the internal radiation dosimetry." Cancer **80**(12 Suppl): 2591-610.
- Beierwalters, W.** (1979). Textbook of nuclear medicine: Clinical applications, Lea & Feibiger. Philadelphia
- Belkacémi, Y.**, P. G. Tsoutsou, et al. (2006). "Évaluation de la radiosensibilité tumorale par l'imagerie fonctionnelle et métabolique : de la recherche à l'application clinique." Cancer Radiother **10**(3): 124-33.
- Bennett, J. M.**, M. S. Kaminski, et al. (2005). "Assessment of treatment-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia in patients with non-Hodgkin lymphoma treated with tositumomab and iodine I131 tositumomab." Blood **105**(12): 4576-82.

- Bernardeau, K.,** S. Gouard, et al. (2005). "Assessment of CD8 involvement in T cell clone avidity by direct measurement of HLA-A2/Mage3 complex density using a high-affinity TCR like monoclonal antibody." Eur J Immunol **35**(10): 2864-75.
- Bernfield, M.,** M. Gotte, et al. (1999). "Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans." Annu Rev Biochem **68**: 729-77.
- Bernfield, M.,** R. Kokenyesi, et al. (1992). "Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans." Annu Rev Cell Biol **8**: 365-93.
- Bertolino, P.,** M. Deckers, et al. (2005). "Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders." Chest **128**(6 Suppl): 585S-590S.
- Blanquicett, C.,** M. W. Saif, et al. (2005). "Antitumor efficacy of capecitabine and celecoxib in irradiated and lead-shielded, contralateral human BxPC-3 pancreatic cancer xenografts: clinical implications of abscopal effects." Clin Cancer Res **11**(24 Pt 1): 8773-81.
- Bloechl, S.,** R. Beck, et al. (2005). "Fractionated locoregional low-dose radioimmunotherapy improves survival in a mouse model of diffuse-type gastric cancer using a 213Bi-conjugated monoclonal antibody." Clin Cancer Res **11**(19 Pt 2): 7070s-7074s.
- Bobik, A.** (2006). "Transforming growth factor-betas and vascular disorders." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(8): 1712-20.
- Bodei, L.,** M. Cremonesi, et al. (2003). "Receptor-mediated radionuclide therapy with 90Y-DOTATOC in association with amino acid infusion: a phase I study." Eur J Nucl Med Mol Imaging **30**(2): 207-16.
- Bodet-Millin, C.,** P. Y. Salun, et al. (2008). La radioimmunothérapie en clinique. 46ème colloque international de médecine nucléaire de langue française.
- Bodey, B.,** B. Bodey, Jr., et al. (1998). "Over-expression of endoglin (CD105): a marker of breast carcinoma-induced neo-vascularization." Anticancer Res **18**(5A): 3621-8.
- Boehm, T.,** J. Folkman, et al. (1997). "Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance." Nature **390**(6658): 404-7.
- Borchardt, P. E.,** R. R. Yuan, et al. (2003). "Targeted actinium-225 in vivo generators for therapy of ovarian cancer." Cancer Res **63**(16): 5084-90.
- Boswell, C. A. and M. W. Brechbiel** (2007). "Development of radioimmunotherapeutic and diagnostic antibodies: an inside-out view." Nucl Med Biol **34**(7): 757-78.
- Bourdeau, A.,** M. E. Faughnan, et al. (2000). "Endoglin-deficient mice, a unique model to study hereditary hemorrhagic telangiectasia." Trends Cardiovasc Med **10**(7): 279-85.

- Brechbiel, M. W.** (1992). "Synthesis of C-functionalized trans-cyclohexylethylenetriaminepentaacetic acids for labeling of monoclonal antibodies with the bismuth 212 α particle emitter." J Chem Soc Perkin Trans **1**: 1173-8.
- Brizel, D. M., S. P. Scully, et al.** (1996). "Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma." Cancer Res **56**(5): 941-3.
- Brule, S., N. Charnaux, et al.** (2006). "The shedding of syndecan-4 and syndecan-1 from HeLa cells and human primary macrophages is accelerated by SDF-1/CXCL12 and mediated by the matrix metalloproteinase-9." Glycobiology **16**(6): 488-501.
- Buhring, H. J., C. A. Muller, et al.** (1991). "Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow." Leukemia **5**(10): 841-7.
- Burke, J. M., P. C. Caron, et al.** (2003). "Cyto reduction with iodine-131-anti-CD33 antibodies before bone marrow transplantation for advanced myeloid leukemias." Bone Marrow Transplant **32**(6): 549-56.
- Burke, P. A., S. J. DeNardo, et al.** (2002). "Cilengitide targeting of $\alpha(v)\beta(3)$ integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts." Cancer Res **62**(15): 4263-72.
- Burrows, F. J., E. J. Derbyshire, et al.** (1995). "Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy." Clin Cancer Res **1**(12): 1623-34.
- Cailleau, R., M. Olivé, et al.** (1978). "Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization." In Vitro **14**(11): 911-5.
- Carey, D. J.** (1997). "Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors." Biochem J **327** (Pt 1): 1-16.
- Carlin, S., G. Akabani, et al.** (2003). "In vitro cytotoxicity of (211)at-astatide and (131)I-iodide to glioma tumor cells expressing the sodium/iodide symporter." J Nucl Med **44**(11): 1827-38.
- Carrasquillo, J. A., J. D. White, et al.** (1999). "Similarities and differences in 111In- and 90Y-labeled 1B4M-DTPA antiTac monoclonal antibody distribution." J Nucl Med **40**(2): 268-76.
- Cassidy, J., D. R. Newell, et al.** (1993). "Pharmacokinetics of high molecular weight agents." Cancer Surv **17**: 315-41.
- Chakravarti, R., V. Sapountzi, et al.** (2005). "Functional role of syndecan-1 cytoplasmic V region in lamellipodial spreading, actin bundling, and cell migration." Mol Biol Cell **16**(8): 3678-91.
- Chappell, L. L., K. A. Deal, et al.** (2000). "Synthesis, conjugation, and radiolabeling of a novel bifunctional chelating agent for (225)Ac radioimmunotherapy applications." Bioconjug Chem **11**(4): 510-9.

- Chatal, J. F.** (2006a). "Radioimmunotherapy, a new breakthrough in the treatment of follicular non-Hodgkin's lymphoma: the European perspective." Cancer Biother Radiopharm **21**(1): 1-4.
- Chatal, J. F., L. Campion, et al.** (2006b). "Survival improvement in patients with medullary thyroid carcinoma who undergo pretargeted anti-carcinoembryonic-antigen radioimmunotherapy: a collaborative study with the French Endocrine Tumor Group." J Clin Oncol **24**(11): 1705-11.
- Cheifetz, S., T. Bellon, et al.** (1992). "Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells." J Biol Chem **267**(27): 19027-30.
- Clairotte, A., I. Lascombe, et al.** (2006). "Expression of E-cadherin and alpha-, beta-, gamma-catenins in patients with bladder cancer: identification of gamma-catenin as a new prognostic marker of neoplastic progression in T1 superficial urothelial tumors." Am J Clin Pathol **125**(1): 119-26.
- Clarke, K., F. T. Lee, et al.** (2000). "Therapeutic efficacy of anti-Lewis(y) humanized 3S193 radioimmunotherapy in a breast cancer model: enhanced activity when combined with taxol chemotherapy." Clin Cancer Res **6**(9): 3621-8.
- Clarke, K., F. T. Lee, et al.** (2000). "In vivo biodistribution of a humanized anti-Lewis Y monoclonal antibody (hu3S193) in MCF-7 xenografted BALB/c nude mice." Cancer Res **60**(17): 4804-11.
- Classe, J. M., V. Bordes, et al.** (2009). "Sentinel lymph node biopsy after neoadjuvant chemotherapy for advanced breast cancer: results of Ganglion Sentinelle et Chimiothérapie Neoadjuvante, a French prospective multicentric study." J Clin Oncol **27**(5): 726-32.
- Colcher, D., G. Pavlinkova, et al.** (1998). "Pharmacokinetics and biodistribution of genetically-engineered antibodies." Q J Nucl Med **42**(4): 225-41.
- Comet, M. and M. Vidal** (1998). "Macromolécules d'intérêt biologique marquée à l'iode." Radiopharmaceutiques, chimie des radiotraceurs et applications biologiques: 349-363.
- Contreras, H., R. Ledezma, et al.** (2009). "The expression of syndecan-1 and -2 is associated with Gleason score and epithelial-mesenchymal transition markers, E-cadherin and beta-catenin, in prostate cancer." Urol Oncol. **16** (Epub ahead of print).
- Couchman, J. R.** (2003). "Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains?" Nat Rev Mol Cell Biol **4**(12): 926-37.
- Couturier, O., S. Supiot, et al.** (2005). "Cancer radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides." Eur J Nucl Med Mol Imaging **32**(5): 601-14.

- Cruickshank, G. S., R. P. Rampling, et al.** (1994). "Direct measurement of the PO₂ distribution in human malignant brain tumours." Adv Exp Med Biol **345**: 465-70.
- Dadachova, E., A. Nguyen, et al.** (2005). "Treatment with rhenium-188-perrhenate and iodine-131 of NIS-expressing mammary cancer in a mouse model remarkably inhibited tumor growth." Nucl Med Biol **32**(7): 695-700.
- Dai, G., O. Levy, et al.** (1996). "Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter." Nature **379**(6564): 458-60.
- Dallas, N. A., S. Samuel, et al.** (2008). "Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy." Clin Cancer Res **14**(7): 1931-7.
- Davis, I. A., K. A. Glowienka, et al.** (1999). "Comparison of 225actinium chelates: tissue distribution and radiotoxicity." Nucl Med Biol **26**(5): 581-9.
- Delaloge, S. and H. Marsiglia** (2005). "[Genetic bases of the radiosensitivity of breast cancer]." Cancer Radiother **9**(2): 77-86.
- Demirci, S., J. Nam, et al.** (2009). "Radiation-induced cardiac toxicity after therapy for breast cancer: interaction between treatment era and follow-up duration." Int J Radiat Oncol Biol Phys **73**(4): 980-7.
- DeNardo, G. L., J. Schlom, et al.** (2002). "Rationales, evidence, and design considerations for fractionated radioimmunotherapy." Cancer **94**(4 Suppl): 1332-48.
- DeNardo, G. L., B. M. Bradt, et al.** (2003). "Human antiglobulin response to foreign antibodies: therapeutic benefit?" Cancer Immunol Immunother **52**(5): 309-16.
- DeNardo, S. J., D. L. Kukis, et al.** (1997). "Synergy of Taxol and radioimmunotherapy with yttrium-90-labeled chimeric L6 antibody: efficacy and toxicity in breast cancer xenografts." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 4000-4.
- DeNardo, G. L., S. J. DeNardo, et al.** (1998). "Low-dose, fractionated radioimmunotherapy for B-cell malignancies using 131I-Lym-1 antibody." Cancer Biother Radiopharm **13**(4): 239-54.
- DeNardo, G. L., S. J. DeNardo, et al.** (2000). "Are radiometal-labeled antibodies better than iodine-131-labeled antibodies: comparative pharmacokinetics and dosimetry of copper-67-, iodine-131-, and yttrium-90-labeled Lym-1 antibody in patients with non-Hodgkin's lymphoma." Clin Lymphoma **1**(2): 118-26.
- DeNardo, G. L., J. Schlom, et al.** (2002). "Rationales, evidence, and design considerations for fractionated radioimmunotherapy." Cancer **94**(4 Suppl): 1332-48.
- DeNardo, S. J., G. L. DeNardo, et al.** (1988). "Treatment of B cell malignancies with 131I Lym-1 monoclonal antibodies." Int J Cancer Suppl **3**: 96-101.
- DeNardo, S. J., G. L. DeNardo, et al.** (1987). "Treatment of a patient with B cell lymphoma by I-131 LYM-1 monoclonal antibodies." Int J Biol Markers **2**(1): 49-53.

- DePalatis, L. R., K. A. Frazier, et al.** (1995). "Lysine reduces renal accumulation of radioactivity associated with injection of the [177Lu]alpha-[2-(4-aminophenyl) ethyl]-1,4,7,10-tetraaza-cyclodecane-1,4,7,10-tetraacetic acid-CC49 Fab radioimmunoconjugate." Cancer Res **55**(22): 5288-95.
- Ding, S., C. Li, et al.** (2006). "Comparative evaluation of microvessel density determined by CD34 or CD105 in benign and malignant gastric lesions." Hum Pathol **37**(7): 861-6.
- Dvorak, H. F.** (2003). "Rous-Whipple Award Lecture. How tumors make bad blood vessels and stroma." Am J Pathol **162**(6): 1747-57.
- Dvorak, H. F., J. A. Nagy, et al.** (1991). "Structure of solid tumors and their vasculature: implications for therapy with monoclonal antibodies." Cancer Cells **3**(3): 77-85.
- El-Gohary, Y. M., J. F. Silverman, et al.** (2007). "Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in prostatic adenocarcinoma." Am J Clin Pathol **127**(4): 572-9.
- Fisher, B., S. Anderson, et al.** (1995). "Reanalysis and results after 12 years of follow-up in a randomized clinical trial comparing total mastectomy with lumpectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer." N Engl J Med **333**(22): 1456-61.
- Ge, A. and E. Butcher** (1994). "Cloning and expression of a cDNA encoding mouse endoglin, an endothelial cell TGF-beta ligand." Gene **138**(1-2): 201-6.
- Fitzgerald, M. L., Z. Wang, et al.** (2000). "Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase." J Cell Biol **148**(4): 811-24.
- Folkman, J.** (1971). "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." N Engl J Med **285**(21): 1182-6.
- Folli, S., A. Pelegrin, et al.** (1993). "Tumor-necrosis factor can enhance radio-antibody uptake in human colon carcinoma xenografts by increasing vascular permeability." Int J Cancer **53**(5): 829-36.
- Fraker, P. J. and J. C. Speck, Jr.** (1978). "Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril." Biochem Biophys Res Commun **80**(4): 849-57.
- Garmestani, K., D. E. Milenic, et al.** (2005). "Purification of cyclotron-produced 203Pb for labeling Herceptin." Nucl Med Biol **32**(3): 301-5.
- Ge, A. and E. Butcher** (1994). "Cloning and expression of a cDNA encoding mouse endoglin, an endothelial cell TGF-beta ligand." Gene **138**(1-2): 201-6.
- Gelderman, K. A., S. Tomlinson, et al.** (2004). "Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy." Trends Immunol **25**(3): 158-64.

- Giuliano, A. E.,** R. C. Jones, et al. (1997). "Sentinel lymphadenectomy in breast cancer." J Clin Oncol **15**(6): 2345-50.
- Goel, A.,** S. Augustine, et al. (2001). "Single-Dose versus fractionated radioimmunotherapy of human colon carcinoma xenografts using 131I-labeled multivalent CC49 single-chain fvs." Clin Cancer Res **7**(1): 175-84.
- Goldenberg, D. M.** (2002). "Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies." J Nucl Med **43**(5): 693-713.
- Goldenberg, D. M.,** R. M. Sharkey, et al. (2006). "Antibody pretargeting advances cancer radioimmunodetection and radioimmunotherapy." J Clin Oncol **24**(5): 823-34.
- Gopal, A. K.,** J. G. Rajendran, et al. (2007). "High-dose [131I]tositumomab (anti-CD20) radioimmunotherapy and autologous hematopoietic stem-cell transplantation for adults > or = 60 years old with relapsed or refractory B-cell lymphoma." J Clin Oncol **25**(11): 1396-402.
- Gos, M.,** J. Miloszewska, et al. (2009). "[Epithelial-mesenchymal transition in cancer progression]." Postepy Biochem **55**(2): 121-8.
- Gotte, M.** (2003). "Syndecans in inflammation." FASEB J. **17**(6): 575-91.
- Gotte, M.,** C. Kersting, et al. (2006). "Predictive value of syndecan-1 expression for the response to neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer." Anticancer Res **26**(1B): 621-7.
- Gotte, M.,** C. Kersting, et al. (2007). "An expression signature of syndecan-1 (CD138), E-cadherin and c-met is associated with factors of angiogenesis and lymphangiogenesis in ductal breast carcinoma in situ." Breast Cancer Res **9**(1): R8.
- Gougos, A. and M. Letarte** (1988). "Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line." J Immunol **141**(6): 1925-33.
- Gougos, A.,** S. St Jacques, et al. (1992). "Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts." Int Immunol **4**(1): 83-92.
- Govinden, R.** (2003). "Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta." Pharmacol Ther **98**(2): 257-65.
- Guarino, M.,** B. Rubino, et al. (2007). "The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology." Pathology **39**(3): 305-18.
- Gray, L. H.,** A. D. Conger, et al. (1953). "The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy." Br J Radiol **26**(312): 638-48.
- Hall, E. J.** (1994). Radiobiology for the radiobiologist. 4th edn. J. L. Company. Philaelpia.

- Harris, E. E.** (2008). "Cardiac mortality and morbidity after breast cancer treatment." Cancer Control **15**(2): 120-9.
- Harrison, L. and K. Blackwell** (2004). "Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy?" Oncologist **9 Suppl 5**: 31-40.
- Hassfjell, S. and M. W. Brechbiel** (2001). "The development of the alpha-particle emitting radionuclides ²¹²Bi and ²¹³Bi, and their decay chain related radionuclides, for therapeutic applications." Chem Rev **101**(7): 2019-36.
- Hauck, M. L., D. O. Coffin, et al.** (1997). "A local hyperthermia treatment which enhances antibody uptake in a glioma xenograft model does not affect tumour interstitial fluid pressure." Int J Hyperthermia **13**(3): 307-16.
- Hauck, M. L. and M. R. Zalutsky** (1998). "The effects of local hyperthermia on the catabolism of a radioiodinated chimeric monoclonal antibody." Clin Cancer Res **4**(9): 2071-7.
- Hauck, M. L. and M. R. Zalutsky** (2005). "Enhanced tumour uptake of radiolabelled antibodies by hyperthermia: Part I: Timing of injection relative to hyperthermia." Int J Hyperthermia **21**(1): 1-11.
- Hauck, M. L. and M. R. Zalutsky** (2005). "Enhanced tumour uptake of radiolabelled antibodies by hyperthermia. Part II: Application of the thermal equivalency equation." Int J Hyperthermia **21**(1): 13-27.
- Hay, E. D.** (2005). "The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it." Dev Dyn **233**(3): 706-20.
- Hayashi, T., S. P. Treon, et al.** (2003). "Recombinant humanized anti-CD40 monoclonal antibody triggers autologous antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against multiple myeloma cells." Br J Haematol **121**(4): 592-6.
- Henriksen, G., B. W. Schoultz, et al.** (2004). "Sterically stabilized liposomes as a carrier for alpha-emitting radium and actinium radionuclides." Nucl Med Biol **31**(4): 441-9.
- Hnatowich, D. J., F. Virzi, et al.** (1985). "DTPA-coupled antibodies labeled with yttrium-90." J Nucl Med **26**(5): 503-9.
- Holliger, P. and P. J. Hudson** (2005). "Engineered antibody fragments and the rise of single domains." Nat Biotechnol **23**(9): 1126-36.
- Horak, E., F. Hartmann, et al.** (1997). "Radioimmunotherapy targeting of HER2/neu oncoprotein on ovarian tumor using lead-212-DOTA-AE1." J Nucl Med **38**(12): 1944-50.
- Hornick, J. L., L. A. Khawli, et al.** (1999). "Pretreatment with a monoclonal antibody/interleukin-2 fusion protein directed against DNA enhances the delivery of therapeutic molecules to solid tumors." Clin Cancer Res **5**(1): 51-60.

- Hughes, O. D., M. C. Bishop, et al.** (2000). "Targeting superficial bladder cancer by the intravesical administration of copper-67-labeled anti-MUC1 mucin monoclonal antibody C595." J Clin Oncol **18**(2): 363-70.
- Humm, J. L. and L. M. Cobb** (1990). "Nonuniformity of tumor dose in radioimmunotherapy." J Nucl Med **31**(1): 75-83.
- Huston, J. S., D. Levinson, et al.** (1988). "Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(16): 5879-83.
- Hwang do, W., J. H. Kang, et al.** (2007). "Development of a dual membrane protein reporter system using sodium iodide symporter and mutant dopamine D2 receptor transgenes." J Nucl Med **48**(4): 588-95.
- Hwang, W. Y. and J. Foote** (2005). "Immunogenicity of engineered antibodies." Methods **36**(1): 3-10.
- Israel, E. J., S. Taylor, et al.** (1997). "Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells." Immunology **92**(1): 69-74.
- Jacene, H. A., R. Filice, et al.** (2007). "Comparison of 90Y-ibritumomab tiuxetan and 131I-tositumomab in clinical practice." J Nucl Med **48**(11): 1767-76.
- Jaggi, J. S., B. J. Kappel, et al.** (2005). "Efforts to control the errant products of a targeted in vivo generator." Cancer Res **65**(11): 4888-95.
- Jain, M., S. C. Chauhan, et al.** (2005). "Penetratin improves tumor retention of single-chain antibodies: a novel step toward optimization of radioimmunotherapy of solid tumors." Cancer Res **65**(17): 7840-6.
- Jain, M., G. Venkatraman, et al.** (2007). "Optimization of radioimmunotherapy of solid tumors: biological impediments and their modulation." Clin Cancer Res **13**(5): 1374-82.
- Jain, R. K.** (1987). "Transport of molecules in the tumor interstitium: a review." Cancer Res **47**(12): 3039-51.
- Jain, R. K.** (2005). "Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy." Science **307**(5706): 58-62.
- Jain, R. K. and L. T. Baxter** (1988). "Mechanisms of heterogeneous distribution of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors: significance of elevated interstitial pressure." Cancer Res **48**(24 Pt 1): 7022-32.
- Jamar, F., R. Barone, et al.** (2003). "86Y-DOTA0)-D-Phe1-Tyr3-octreotide (SMT487)--a phase 1 clinical study: pharmacokinetics, biodistribution and renal protective effect of different regimens of amino acid co-infusion." Eur J Nucl Med Mol Imaging **30**(4): 510-8.

- Jemal, A.,** T. Murray, et al. (2005). "Cancer statistics, 2005." CA Cancer J Clin **55**(1): 10-30.
- Johnson, E. L.,** T. G. Turkington, et al. (1995). "Quantitation of ²¹¹At in small volumes for evaluation of targeted radiotherapy in animal models." Nucl Med Biol **22**(1): 45-54.
- Jones, P. T.,** P. H. Dear, et al. (1986). "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse." Nature **321**(6069): 522-5.
- De Jong, M.,** R. Valkema, et al. (2002). "Somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy of tumors: preclinical and clinical findings." Semin Nucl Med **32**(2): 133-40.
- De Jong, M.,** D. Kwekkeboom, et al. (2003). "Radiolabelled peptides for tumour therapy: current status and future directions. Plenary lecture at the EANM 2002." Eur J Nucl Med Mol Imaging **30**(3): 463-9.
- de Jong, M.,** R. Barone, et al. (2005). "Megalin is essential for renal proximal tubule reabsorption of (111)In-DTPA-octreotide." J Nucl Med **46**(10): 1696-700.
- Junghans, R. P. and C. L. Anderson** (1996). "The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(11): 5512-6.
- Jurcic, J. G.,** P. C. Caron, et al. (1995). "Radiolabeled anti-CD33 monoclonal antibody M195 for myeloid leukemias." Cancer Res **55**(23 Suppl): 5908s-5910s.
- Jurcic, J. G.,** T. DeBlasio, et al. (2000). "Molecular remission induction with retinoic acid and anti-CD33 monoclonal antibody HuM195 in acute promyelocytic leukemia." Clin Cancer Res **6**(2): 372-80.
- Jurcic, J. G.,** S. M. Larson, et al. (2002). "Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia." Blood **100**(4): 1233-9.
- Juweid, M. E.,** E. Stadtmauer, et al. (1999). "Pharmacokinetics, dosimetry, and initial therapeutic results with ¹³¹I- and (111)In-/90Y-labeled humanized LL2 anti-CD22 monoclonal antibody in patients with relapsed, refractory non-Hodgkin's lymphoma." Clin Cancer Res **5**(10 Suppl): 3292s-3303s.
- Kaminski, M. S.,** M. Tuck, et al. (2005). "¹³¹I-tositumomab therapy as initial treatment for follicular lymphoma." N Engl J Med **352**(5): 441-9.
- Kaminski, M. S.,** K. R. Zasadny, et al. (1996). "Iodine-131-anti-B1 radioimmunotherapy for B-cell lymphoma." J Clin Oncol **14**(7): 1974-81.
- Kaminski, M. S.,** A. D. Zelenetz, et al. (2001). "Pivotal study of iodine I 131 tositumomab for chemotherapy-refractory low-grade or transformed low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas." J Clin Oncol **19**(19): 3918-28.
- Karonen, S. L.** (1990). "Developments in techniques for radioiodination of peptide hormones and other proteins." Scand J Clin Lab Invest Suppl **201**: 135-8.

- Kaspersen, F. M., E. Bos, et al.** (1995). "Cytotoxicity of ^{213}Bi - and ^{225}Ac -immunoconjugates." Nucl Med Commun **16**(6): 468-76.
- Kassis, A. I. and S. J. Adelstein** (2005). "Radiobiologic principles in radionuclide therapy." J Nucl Med **46**: Suppl 1: 4S-12S.
- Kato, M., S. Saunders, et al.** (1995). "Loss of cell surface syndecan-1 causes epithelia to transform into anchorage-independent mesenchyme-like cells." Mol Biol Cell **6**(5): 559-76.
- Kay, N. E., N. D. Bone, et al.** (2002). "B-CLL cells are capable of synthesis and secretion of both pro- and anti-angiogenic molecules." Leukemia **16**(5): 911-9.
- Kelly, M. P., F. T. Lee, et al.** (2006). "Enhanced efficacy of ^{90}Y -radiolabeled anti-Lewis Y humanized monoclonal antibody hu3S193 and paclitaxel combined-modality radioimmunotherapy in a breast cancer model." J Nucl Med **47**(4): 716-25.
- Kennel, S. J., R. Boll, et al.** (1999). "Radioimmunotherapy of micrometastases in lung with vascular targeted ^{213}Bi ." Br J Cancer **80**(1-2): 175-84.
- Kennel, S. J., M. W. Brechbiel, et al.** (2002). "Actinium-225 conjugates of MAb CC49 and humanized delta CH2CC49." Cancer Biother Radiopharm **17**(2): 219-31.
- Kennel, S. J., L. L. Chappell, et al.** (2000). "Evaluation of ^{225}Ac for vascular targeted radioimmunotherapy of lung tumors." Cancer Biother Radiopharm **15**(3): 235-44.
- Kerbel, R. S.** (1991). "Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents." Bioessays **13**(1): 31-6.
- Khazaeli, M. B., R. M. Conry, et al.** (1994). "Human immune response to monoclonal antibodies." J Immunother Emphasis Tumor Immunol **15**(1): 42-52.
- Kinuya, S., K. Yokoyama, et al.** (2000). "Pharmacologic intervention with angiotensin II and kininase inhibitor enhanced efficacy of radioimmunotherapy in human colon cancer xenografts." J Nucl Med **41**(7): 1244-9.
- Kinuya, S., A. Kawashima, et al.** (2001). "Anti-angiogenic therapy and radioimmunotherapy in colon cancer xenografts." Eur J Nucl Med **28**(9): 1306-12.
- Kinuya, S., K. Yokoyama, et al.** (2004). "Optimization of radioimmunotherapy interactions with hyperthermia." Int J Hyperthermia **20**(2): 190-200.
- Kinuya, S., K. Yokoyama, et al.** (1998). "Persistent distension and enhanced diffusive extravasation of tumor vessels improved uniform tumor targeting of radioimmunoconjugate in mice administered with angiotensin II and kininase inhibitor." Oncol Res **10**(11-12): 551-9.

- Kinuya, S., K. Yokoyama, et al.** (1997). "Short-period-induced hypertension could improve tumor-to-nontumor ratios of radiolabeled monoclonal antibody." Nucl Med Biol **24**(6): 547-51.
- Kwekkeboom, D. J., W. H. Bakker, et al.** (2003). "Treatment of patients with gastro-entero-pancreatic (GEP) tumours with the novel radiolabelled somatostatin analogue [¹⁷⁷Lu-DOTA(0),Tyr3]octreotate." Eur J Nucl Med Mol Imaging **30**(3): 417-22.
- Knox, S. J.** (1995). "Overview of studies on experimental radioimmunotherapy." Cancer Res **55**(23 Suppl): 5832s-5836s.
- Kobayashi, H., N. Le, et al.** (1999). "The pharmacokinetic characteristics of glycolated humanized anti-Tac Fabs are determined by their isoelectric points." Cancer Res **59**(2): 422-30.
- Kobayashi, N., Y. Suzuki, et al.** (2002). "FcRn-mediated transcytosis of immunoglobulin G in human renal proximal tubular epithelial cells." Am J Physiol Renal Physiol **282**(2): F358-65.
- Kraeber-Bodere, F., S. Bardet, et al.** (1999). "Radioimmunotherapy in medullary thyroid cancer using bispecific antibody and iodine 131-labeled bivalent hapten: preliminary results of a phase I/II clinical trial." Clin Cancer Res **5**(10 Suppl): 3190s-3198s.
- Kraeber-Bodere, F., A. Faivre-Chauvet, et al.** (1999). "Toxicity and efficacy of radioimmunotherapy in carcinoembryonic antigen-producing medullary thyroid cancer xenograft: comparison of iodine 131-labeled F(ab')₂ and pretargeted bivalent hapten and evaluation of repeated injections." Clin Cancer Res **5**(10 Suppl): 3183s-3189s.
- Kraeber-Bodere, F., C. Sai-Maurel, et al.** (2002). "Enhanced antitumor activity of combined pretargeted radioimmunotherapy and paclitaxel in medullary thyroid cancer xenograft." Mol Cancer Ther **1**(4): 267-74.
- Kraeber-Bodere, F., C. Rousseau, et al.** (2006). "Targeting, toxicity, and efficacy of 2-step, pretargeted radioimmunotherapy using a chimeric bispecific antibody and ¹³¹I-labeled bivalent hapten in a phase I optimization clinical trial." J Nucl Med **47**(2): 247-55.
- Krag, D., D. Weaver, et al.** (1998). "The sentinel node in breast cancer--a multicenter validation study." N Engl J Med **339**(14): 941-6.
- Krenning, E. P., W. H. Bakker, et al.** (1989). "Localisation of endocrine-related tumours with radioiodinated analogue of somatostatin." Lancet **1**(8632): 242-4.
- Kumar, P.** (2000). "Impact of Anemia in Patients With Head and Neck Cancer." Oncologist **5** Suppl 2: 13-18.
- Kumar, P., J. M. Wang, et al.** (1996). "CD 105 and angiogenesis." J Pathol **178**(4): 363-6.
- Kumar, S., A. Ghellal, et al.** (1999). "Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis." Cancer Res **59**(4): 856-61.

- Kurizaki, T.,** M. Abe, et al. (2004). "Role of polymorphonuclear leukocytes, nitric oxide synthase, and cyclooxygenase in vascular permeability changes induced by C5a agonist peptides." Mol Cancer Ther **3**(1): 85-91.
- Kurizaki, T.,** S. Okazaki, et al. (2002). "Potentiation of radioimmunotherapy with response-selective peptide agonist of human C5a." J Nucl Med **43**(7): 957-67.
- Larsen, R. H.** (2003). Proceedings of the 25th American Chemical Society National Meetings, New Orleans.
- Larsen, R. H.,** P. Hoff, et al. (1995). "Alpha-particle radiotherapy with ²¹¹At-labeled monodisperse polymer particles, ²¹¹At-labeled IgG proteins, and free ²¹¹At in a murine intraperitoneal tumor model." Gynecol Oncol **57**(1): 9-15.
- Larsen, R. H.,** B. W. Wieland, et al. (1996). "Evaluation of an internal cyclotron target for the production of ²¹¹At via the ²⁰⁹Bi (alpha,2n)²¹¹At reaction." Appl Radiat Isot **47**(2): 135-43.
- Lartigau, E.,** A. M. Le Ridant, et al. (1993). "Oxygenation of head and neck tumors." Cancer **71**(7): 2319-25.
- Lartigau, E.,** H. Randrianarivelo, et al. (1997). "Intratumoral oxygen tension in metastatic melanoma." Melanoma Res **7**(5): 400-6.
- Lastres, P.,** T. Bellon, et al. (1992). "Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen." Eur J Immunol **22**(2): 393-7.
- Lee, S. Y.,** Y. D. Hong, et al. (2009). "Radiolabeling of monoclonal anti-CD105 with (¹⁷⁷)Lu for potential use in radioimmunotherapy." Appl Radiat Isot **67**(7-8): 1366-9.
- Leget, G. A. and M. S. Czuczman** (1998). "Use of rituximab, the new FDA-approved antibody." Curr Opin Oncol **10**(6): 548-51.
- Leivonen, M.,** J. Lundin, et al. (2004). "Prognostic value of syndecan-1 expression in breast cancer." Oncology **67**(1): 11-8.
- Letamendia, A.,** P. Lastres, et al. (1998). "Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan." J Biol Chem **273**(49): 33011-9.
- Leung, S. O.,** D. M. Goldenberg, et al. (1995). "Construction and characterization of a humanized, internalizing, B-cell (CD22)-specific, leukemia/lymphoma antibody, LL2." Mol Immunol **32**(17-18): 1413-27.
- Leunig, M.,** A. E. Goetz, et al. (1992). "Interstitial fluid pressure in solid tumors following hyperthermia: possible correlation with therapeutic response." Cancer Res **52**(2): 487-90.
- Li, C.,** B. Guo, et al. (2000). "Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer." Int J Cancer **89**(2): 122-6.

- Li, C.,** I. N. Hampson, et al. (2000). "CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells." Faseb J **14**(1): 55-64.
- Li, D. Y.,** L. K. Sorensen, et al. (1999). "Defective angiogenesis in mice lacking endoglin." Science **284**(5419): 1534-7.
- Li, X. F.,** S. Kinuya, et al. (2002). "Benefits of combined radioimmunotherapy and anti-angiogenic therapy in a liver metastasis model of human colon cancer cells." Eur J Nucl Med Mol Imaging **29**(12): 1669-74.
- Liersch, T.,** J. Meller, et al. (2005). "Phase II trial of carcinoembryonic antigen radioimmunotherapy with 131I-labetuzumab after salvage resection of colorectal metastases in the liver: five-year safety and efficacy results." J Clin Oncol **23**(27): 6763-70.
- Linden, O.,** C. Hindorf, et al. (2005). "Dose-fractionated radioimmunotherapy in non-Hodgkin's lymphoma using DOTA-conjugated, 90Y-radiolabeled, humanized anti-CD22 monoclonal antibody, epratuzumab." Clin Cancer Res **11**(14): 5215-22.
- Lindmo, T.,** E. Boven, et al. (1984). "Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess." J Immunol Methods **72**(1): 77-89.
- Liu, S. Y.,** J. F. Eary, et al. (1998). "Follow-up of relapsed B-cell lymphoma patients treated with iodine-131-labeled anti-CD20 antibody and autologous stem-cell rescue." J Clin Oncol **16**(10): 3270-8.
- Liu, S.** (2008). "Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides." Advanced Drug Delivery Reviews **60**: 1347.
- Lonberg, N.** (2005). "Human antibodies from transgenic animals." Nat Biotechnol **23**(9): 1117-25.
- Loussouarn, D.,** L. Campion, et al. (2008). "Prognostic impact of syndecan-1 expression in invasive ductal breast carcinomas." Br J Cancer **98**(12): 1993-8.
- Lucignani, G.** (2008). "Alpha-particle radioimmunotherapy with astatine-211 and bismuth-213." Eur J Nucl Med Mol Imaging **35**(9): 1729-33.
- Maeda, T.,** C. M. Alexander, et al. (2004). "Induction of syndecan-1 expression in stromal fibroblasts promotes proliferation of human breast cancer cells." Cancer Res **64**(2): 612-21.
- Maeda, T.,** J. Desouky, et al. (2006). "Syndecan-1 expression by stromal fibroblasts promotes breast carcinoma growth in vivo and stimulates tumor angiogenesis." Oncogene **25**(9): 1408-12.

- Mahe, M. A.,** P. Fumoleau, et al. (1999). "A phase II study of intraperitoneal radioimmunotherapy with iodine-131-labeled monoclonal antibody OC-125 in patients with residual ovarian carcinoma." Clin Cancer Res 5(10 Suppl): 3249s-3253s.
- Marchal, C.,** L. Rangeard, et al. (2005). "[Anemia impact on treatments of cervical carcinomas]." Cancer Radiother 9(2): 87-95.
- Marcus, R. and A. Hagenbeek** (2007). "The therapeutic use of rituximab in non-Hodgkin's lymphoma." Eur J Haematol Suppl(67): 5-14.
- Marshall, L. J.,** L. S. Ramdin, et al. (2003). "Plasminogen activator inhibitor-1 supports IL-8-mediated neutrophil transendothelial migration by inhibition of the constitutive shedding of endothelial IL-8/heparan sulfate/syndecan-1 complexes." J Immunol 171(4): 2057-65.
- Matsuda, K.,** H. Maruyama, et al. (2001). "Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells." Cancer Res 61(14): 5562-9.
- Mattern, J.,** F. Kallinowski, et al. (1996). "Association of resistance-related protein expression with poor vascularization and low levels of oxygen in human rectal cancer." Int J Cancer 67(1): 20-3.
- Mausner, L. F.,** K. L. Kolsky, et al. (1998). "Radionuclide development at BNL for nuclear medicine therapy." Appl Radiat Isot 49(4): 285-94.
- McDevitt, M. R.,** D. Ma, et al. (2001). "Tumor therapy with targeted atomic nanogenerators." Science 294(5546): 1537-40.
- McLaughlin, P.,** A. J. Grillo-Lopez, et al. (1998). "Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program." J Clin Oncol 16(8): 2825-33.
- Melis, M.,** E. P. Krenning, et al. (2005). "Localisation and mechanism of renal retention of radiolabelled somatostatin analogues." Eur J Nucl Med Mol Imaging 32(10): 1136-43.
- Melton, R. G.,** J. A. Rowland, et al. (1993). "Tumour necrosis factor increases tumour uptake of co-administered antibody-carboxypeptidase G2 conjugate." Eur J Cancer 29A(8): 1177-83.
- Mennerich, D.,** A. Vogel, et al. (2004). "Shift of syndecan-1 expression from epithelial to stromal cells during progression of solid tumours." Eur J Cancer 40(9): 1373-82.
- Meredith, R. F.,** R. D. Alvarez, et al. (2001). "Intraperitoneal radioimmunotherapy of ovarian cancer: a phase I study." Cancer Biother Radiopharm 16(4): 305-15.
- Miederer, M.,** M. R. McDevitt, et al. (2004). "Pharmacokinetics, dosimetry, and toxicity of the targetable atomic generator, 225Ac-HuM195, in nonhuman primates." J Nucl Med 45(1): 129-37.

- Miederer, M.,** D. A. Scheinberg, et al. (2008). "Realizing the potential of the Actinium-225 radionuclide generator in targeted alpha particle therapy applications." Adv Drug Deliv Rev **60**(12): 1371-82.
- Milenic, D. E.,** E. D. Brady, et al. (2004). "Antibody-targeted radiation cancer therapy." Nat Rev Drug Discov **3**(6): 488-99.
- Milenic, D. E.,** T. Yokota, et al. (1991). "Construction, binding properties, metabolism, and tumor targeting of a single-chain Fv derived from the pancarcinoma monoclonal antibody CC49." Cancer Res **51**(23 Pt 1): 6363-71.
- Mirick, G. R.,** R. T. O'Donnell, et al. (1999). "Transfer of copper from a chelated ^{67}Cu -antibody conjugate to ceruloplasmin in lymphoma patients." Nucl Med Biol **26**(7): 841-5.
- Mishra, A. K.,** N. Iznaga-Escobar, et al. (2002). "Preparation and comparative evaluation of $^{99\text{mTc}}$ -labeled 2-iminothiolane modified antibodies and CITC-DTPA immunoconjugates of anti-EGF-receptor antibodies." Methods Find Exp Clin Pharmacol **24**(10): 653-60.
- Mittal, B. B.,** A. M. Zimmer, et al. (1992). "Effects of hyperthermia and iodine-131-labeled anticarcinoembryonic antigen monoclonal antibody on human tumor xenografts in nude mice." Cancer **70**(12): 2785-91.
- Mittal, B. B.,** M. A. Zimmer, et al. (1996). "Phase I/II trial of combined ^{131}I anti-CEA monoclonal antibody and hyperthermia in patients with advanced colorectal adenocarcinoma." Cancer **78**(9): 1861-70.
- Morrison, S. L.,** M. J. Johnson, et al. (1984). "Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(21): 6851-5.
- Moss, T. J.** (1999). "Clinical relevance of minimal residual cancer in patients with solid malignancies." Cancer Metastasis Rev **18**(1): 91-100.
- Movsas, B.,** J. D. Chapman, et al. (2000). "Increasing levels of hypoxia in prostate carcinoma correlate significantly with increasing clinical stage and patient age: an Eppendorf pO(2) study." Cancer **89**(9): 2018-24.
- Nadler, L. M.,** P. Stashenko, et al. (1980). "Serotherapy of a patient with a monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen." Cancer Res **40**(9): 3147-54.
- Nakamoto, Y.,** T. Saga, et al. (2000). "Establishment and characterization of a breast cancer cell line expressing Na^+/I^- symporters for radioiodide concentrator gene therapy." J Nucl Med **41**(11): 1898-904.
- Nakamura, K. and A. Kubo** (1994). "Effect of interleukin-2 on the biodistribution of technetium- $^{99\text{m}}$ -labelled anti-CEA monoclonal antibody in mice bearing human tumour xenografts." Eur J Nucl Med **21**(9): 924-9.

- Nakamura, K. and A. Kubo** (1997). "Biodistribution of iodine-125 labeled monoclonal antibody/interleukin-2 immunoconjugate in athymic mice bearing human tumor xenografts." Cancer **80**(12 Suppl): 2650-5.
- Nieder, C., M. Adam, et al.** (2006). "Therapeutic options for recurrent high-grade glioma in adult patients: recent advances." Crit Rev Oncol Hematol **60**(3): 181-93.
- Nikolaos, A. D., S. Saluel, et al.** (2008). "Endoglin (CD105) : a marker of tumor vasculature and potential target for therapy." Clin Cancer Res **14**(7): 1931-37.
- Nordsmark, M., S. M. Bentzen, et al.** (2005). "Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study." Radiother Oncol **77**(1): 18-24.
- Nourigat, C., C. C. Badger, et al.** (1990). "Treatment of lymphoma with radiolabeled antibody: elimination of tumor cells lacking target antigen." J Natl Cancer Inst **82**(1): 47-50.
- Novak-Hofer, I. and P. A. Schubiger** (2002). "Copper-67 as a therapeutic nuclide for radioimmunotherapy." Eur J Nucl Med Mol Imaging **29**(6): 821-30.
- Novak-Hofer, I., K. Zimmermann, et al.** (1997). "Tumor uptake and metabolism of copper-67-labeled monoclonal antibody chCE7 in nude mice bearing neuroblastoma xenografts." J Nucl Med **38**(4): 536-44.
- Otte, A., R. Herrmann, et al.** (1999). "[Yttrium 90 DOTATOC: a new somatostatin analog for cancer therapy of neuroendocrine tumors]." Praxis (Bern 1994) **88**(31-32): 1263-8.
- Palm, S., T. Back, et al.** (2007). "Therapeutic efficacy of astatine-211-labeled trastuzumab on radioresistant SKOV-3 tumors in nude mice." Int J Radiat Oncol Biol Phys **69**(2): 572-9.
- Park, C. C., M. Mitsumori, et al.** (2000). "Outcome at 8 years after breast-conserving surgery and radiation therapy for invasive breast cancer: influence of margin status and systemic therapy on local recurrence." J Clin Oncol **18**(8): 1668-75.
- Pedley, R. B., J. A. Boden, et al.** (1993). "Comparative radioimmunotherapy using intact or F(ab')₂ fragments of ¹³¹I anti-CEA antibody in a colonic xenograft model." Br J Cancer **68**(1): 69-73.
- Peterson, J. A., E. W. Blank, et al.** (1997). "Effect of multiple, repeated doses of radioimmunotherapy on target antigen expression (breast MUC-1 mucin) in breast carcinomas." Cancer Res **57**(6): 1103-8.
- Petrich, T., H. J. Helmeke, et al.** (2002). "Establishment of radioactive astatine and iodine uptake in cancer cell lines expressing the human sodium/iodide symporter." Eur J Nucl Med Mol Imaging **29**(7): 842-54.

- Pichuantes, S., S. Vera, et al.** (1997). "Mapping epitopes to distinct regions of the extracellular domain of endoglin using bacterially expressed recombinant fragments." Tissue Antigens **50**(3): 265-76.
- Postema, E. J., J. M. Raemaekers, et al.** (2003). "Final results of a phase I radioimmunotherapy trial using (186)Re-epratuzumab for the treatment of patients with non-Hodgkin's lymphoma." Clin Cancer Res **9**(10 Pt 2): 3995S-4002S.
- Pouget, J. P. and S. J. Mather** (2001). "General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation." Eur J Nucl Med **28**(4): 541-61.
- Press, O. W., J. F. Eary, et al.** (1993). "Radiolabeled-antibody therapy of B-cell lymphoma with autologous bone marrow support." N Engl J Med **329**(17): 1219-24.
- Press, O. W., J. F. Eary, et al.** (1995). "Phase II trial of 131I-B1 (anti-CD20) antibody therapy with autologous stem cell transplantation for relapsed B cell lymphomas." Lancet **346**(8971): 336-40.
- Press, O. W., J. F. Eary, et al.** (2000). "A phase I/II trial of iodine-131-tositumomab (anti-CD20), etoposide, cyclophosphamide, and autologous stem cell transplantation for relapsed B-cell lymphomas." Blood **96**(9): 2934-42.
- Press, O. W. and J. Rasey** (2000). "Principles of radioimmunotherapy for hematologists and oncologists." Semin Oncol **27**(6 Suppl 12): 62-73.
- Press, O. W., J. M. Unger, et al.** (2003). "A phase 2 trial of CHOP chemotherapy followed by tositumomab/iodine I 131 tositumomab for previously untreated follicular non-Hodgkin lymphoma: Southwest Oncology Group Protocol S9911." Blood **102**(5): 1606-12.
- Quackenbush, E. J. and M. Letarte** (1985). "Identification of several cell surface proteins of non-T, non-B acute lymphoblastic leukemia by using monoclonal antibodies." J Immunol **134**(2): 1276-85.
- Raleigh, J. A., M. W. Dewhirst, et al.** (1996). "Measuring Tumor Hypoxia." Semin Radiat Oncol **6**(1): 37-45.
- Robinson, M. K., C. Shaller, et al.** (2008). "Effective treatment of established human breast tumor xenografts in immunodeficient mice with a single dose of the alpha-emitting radioisotope astatine-211 conjugated to anti-HER2/neu diabodies." Clin Cancer Res **14**(3): 875-82.
- Rosebrough, S. F.** (1996). "Two-step immunological approaches for imaging and therapy." Q J Nucl Med **40**(3): 234-51.
- Rutherford, R. A., A. Smith, et al.** (1997). "Differential inhibitory effect of L-lysine on renal accumulation of 67Cu-labelled F(ab')₂ fragments in mice." Int J Cancer **72**(3): 522-9.

- Saad, R. S., Y. El-Gohary, et al.** (2005). "Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in esophageal adenocarcinoma." Hum Pathol **36**(9): 955-61.
- Sasisekharan, R., Z. Shriver, et al.** (2002). "Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer." Nat Rev Cancer **2**(7): 521-8.
- Scheinberg, D. A., D. Lovett, et al.** (1991). "A phase I trial of monoclonal antibody M195 in acute myelogenous leukemia: specific bone marrow targeting and internalization of radionuclide." J Clin Oncol **9**(3): 478-90.
- Schlom, J., D. Eggenberger, et al.** (1992). "Therapeutic advantage of high-affinity anticarcinoma radioimmunoconjugates." Cancer Res **52**(5): 1067-72.
- Schlom, J., A. Molinolo, et al.** (1990). "Advantage of dose fractionation in monoclonal antibody-targeted radioimmunotherapy." J Natl Cancer Inst **82**(9): 763-71.
- Schwartz, M. A., D. R. Lovett, et al.** (1993). "Dose-escalation trial of M195 labeled with iodine 131 for cytoablation and marrow ablation in relapsed or refractory myeloid leukemias." J Clin Oncol **11**(2): 294-303.
- Sgouros, G., A. M. Ballangrud, et al.** (1999). "Pharmacokinetics and dosimetry of an alpha-particle emitter labeled antibody: 213Bi-HuM195 (anti-CD33) in patients with leukemia." J Nucl Med **40**(11): 1935-46.
- Sharkey, R. M. and D. M. Goldenberg** (2005). "Perspectives on cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies." J Nucl Med **46 Suppl 1**: 115S-27S.
- Silverman, D. H., E. S. Delpassand, et al.** (2004). "Radiolabeled antibody therapy in non-Hodgkins lymphoma: radiation protection, isotope comparisons and quality of life issues." Cancer Treat Rev **30**(2): 165-72.
- Smit, J. A., J. A. Myburgh, et al.** (1973). "Specific inactivation of sensitized lymphocytes in vitro using antigens labelled with astatine-211." Clin Exp Immunol **14**(1): 107-16.
- Smit, J. W., J. P. Shroder-van der Elst, et al.** (2000). "Reestablishment of in vitro and in vivo iodide uptake by transfection of the human sodium iodide symporter (hNIS) in a hNIS defective human thyroid carcinoma cell line." Thyroid **10**(11): 939-43.
- Smith, A., R. Alberto, et al.** (1993). "Preclinical evaluation of 67Cu-labeled intact and fragmented anti-colon carcinoma monoclonal antibody MAb35." Cancer Res **53**(23): 5727-33.
- Song, E. Y., S. M. Abbas Rizvi, et al.** (2007). "Pharmacokinetics and toxicity of (213)Bi-labeled PAI2 in preclinical targeted alpha therapy for cancer." Cancer Biol Ther **6**(6): 898-904.
- Soyland, C. and S. P. Hassfjell** (2000). "Survival of human lung epithelial cells following in vitro alpha-particle irradiation with absolute determination of the number of alpha-particle traversals of individual cells." Int J Radiat Biol **76**(10): 1315-22.

- Spitzweg, C., C. M. Dutton, et al.** (2001). "Expression of the sodium iodide symporter in human kidney." Kidney Int **59**(3): 1013-23.
- Spitzweg, C., W. Joba, et al.** (1998). "Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa." J Clin Endocrinol Metab **83**(5): 1746-51.
- St-Jacques, S., U. Cymerman, et al.** (1994). "Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells." Endocrinology **134**(6): 2645-57.
- Stanley, M. J., M. W. Stanley, et al.** (1999). "Syndecan-1 expression is induced in the stroma of infiltrating breast carcinoma." Am J Clin Pathol **112**(3): 377-83.
- Stashenko, P., L. M. Nadler, et al.** (1980). "Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen." J Immunol **125**(4): 1678-85.
- Strickland, D. K., G. Vaidyanathan, et al.** (1994). "Cytotoxicity of alpha-particle-emitting m-[211At]astatobenzylguanidine on human neuroblastoma cells." Cancer Res **54**(20): 5414-9.
- Supiot, S., A. Faivre-Chauvet, et al.** (2002). "Comparison of the biologic effects of MA5 and B-B4 monoclonal antibody labeled with iodine-131 and bismuth-213 on multiple myeloma." Cancer **94**(4 Suppl): 1202-9.
- Supiot, S., S. Gouard, et al.** (2005). "Mechanisms of cell sensitization to alpha radioimmunotherapy by doxorubicin or paclitaxel in multiple myeloma cell lines." Clin Cancer Res **11**(19 Pt 2): 7047s-7052s.
- Supiot, S., F. Thillays, et al.** (2007). "Gemcitabine radiosensitizes multiple myeloma cells to low let, but not high let, irradiation." Radiother Oncol **83**(1): 97-101.
- Tabata, M., M. Kondo, et al.** (1999). "Antiangiogenic radioimmunotherapy of human solid tumors in SCID mice using (125)I-labeled anti-endoglin monoclonal antibodies." Int J Cancer **82**(5): 737-42.
- Takahashi, N., R. Kawanishi-Tabata, et al.** (2001). "Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin." Clin Cancer Res **7**(3): 524-32.
- Takahashi, N., A. Haba, et al.** (2001). "Antiangiogenic therapy of established tumors in human skin/severe combined immunodeficiency mouse chimeras by anti-endoglin (CD105) monoclonal antibodies, and synergy between anti-endoglin antibody and cyclophosphamide." Cancer Res **61**(21): 7846-54.
- Tanimoto, M., D. A. Scheinberg, et al.** (1989). "Restricted expression of an early myeloid and monocytic cell surface antigen defined by monoclonal antibody M195." Leukemia **3**(5): 339-48.

- Tannock, I. F.** (1968). "The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour." Br J Cancer **22**(2): 258-73.
- Tassone, P., V. S. Goldmacher, et al.** (2004). "Cytotoxic activity of the maytansinoid immunoconjugate B-B4-DM1 against CD138+ multiple myeloma cells." Blood **104**(12): 3688-96.
- Tazebay, U. H., I. L. Wapnir, et al.** (2000). "The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer." Nat Med **6**(8): 871-8.
- Tedder, T. F., A. W. Boyd, et al.** (1985). "The B cell surface molecule B1 is functionally linked with B cell activation and differentiation." J Immunol **135**(2): 973-9.
- Thomlinson, R. H. and L. H. Gray** (1955). "The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy." Br J Cancer **9**(4): 539-49.
- Tinsley, J. H., M. H. Wu, et al.** (1999). "Activated neutrophils induce hyperpermeability and phosphorylation of adherens junction proteins in coronary venular endothelial cells." J Biol Chem **274**(35): 24930-4.
- Tkachenko, E., J. M. Rhodes, et al.** (2005). "Syndecans: new kids on the signaling block." Circ Res **96**(5): 488-500.
- Tong, R. T., Y. Boucher, et al.** (2004). "Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors." Cancer Res **64**(11): 3731-6.
- Upadhyay, G., R. Singh, et al.** (2003). "Functional expression of sodium iodide symporter (NIS) in human breast cancer tissue." Breast Cancer Res Treat **77**(2): 157-65.
- Vandenbulcke, K., F. De Vos, et al.** (2003). "In vitro evaluation of ²¹³Bi-rituximab versus external gamma irradiation for the treatment of B-CLL patients: relative biological efficacy with respect to apoptosis induction and chromosomal damage." Eur J Nucl Med Mol Imaging **30**(10): 1357-64.
- Van Eerd, J. E., E. Vegt, et al.** (2006). "Gelatin-based plasma expander effectively reduces renal uptake of ¹¹¹In-octreotide in mice and rats." J Nucl Med **47**(3): 528-33.
- Vaupel, P.** (1997). "Blood flow and oxygenation status of head and neck carcinomas." Adv Exp Med Biol **428**: 89-95.
- Vaupel, P., S. Briest, et al.** (2002). "Hypoxia in breast cancer: pathogenesis, characterization and biological/therapeutic implications." Wien Med Wochenschr **152**(13-14): 334-42.
- Vaupel, P., O. Thews, et al.** (2001). "Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia." Med Oncol **18**(4): 243-59.
- Vayre, L., J. C. Sabourin, et al.** (1999). "Immunohistochemical analysis of Na⁺/I⁻ symporter distribution in human extra-thyroidal tissues." Eur J Endocrinol **141**(4): 382-6.

- Vogel, C. A., M. C. Galmiche, et al.** (1997). "Radioimmunotherapy and fractionated radiotherapy of human colon cancer liver metastases in nude mice." Cancer Res **57**(3): 447-53.
- Vose, J. M., D. Colcher, et al.** (2000). "Phase I/II trial of multiple dose ¹³¹Iodine-MAb LL2 (CD22) in patients with recurrent non-Hodgkin's lymphoma." Leuk Lymphoma **38**(1-2): 91-101.
- Vuillez, J. P., F. Kraeber-Bodere, et al.** (1999). "Radioimmunotherapy of small cell lung carcinoma with the two-step method using a bispecific anti-carcinoembryonic antigen/anti-diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) antibody and iodine-131 Di-DTPA hapten: results of a phase I/II trial." Clin Cancer Res **5**(10 Suppl): 3259s-3267s.
- Waldherr, C., M. Pless, et al.** (2001). "The clinical value of [⁹⁰Y-DOTA]-D-Phe1-Tyr3-octreotide (⁹⁰Y-DOTATOC) in the treatment of neuroendocrine tumours: a clinical phase II study." Ann Oncol **12**(7): 941-5.
- Wilder, R. B., V. K. Langmuir, et al.** (1993). "Local hyperthermia and SR 4233 enhance the antitumor effects of radioimmunotherapy in nude mice with human colonic adenocarcinoma xenografts." Cancer Res **53**(13): 3022-7.
- Wijdenes, J., W. C. Vooijs, et al.** (1996). "A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1." Br J Haematol **94**(2): 318-23.
- Winkler, F., S. V. Kozin, et al.** (2004). "Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases." Cancer Cell **6**(6): 553-63.
- Woof, J. M. and D. R. Burton** (2004). "Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures." Nat Rev Immunol **4**(2): 89-99.
- Yang, L. Y., W. Q. Lu, et al.** (2006). "Correlation between CD105 expression and postoperative recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma." BMC Cancer **6**: 110.
- Ychou, M. and A. Pelegrin** (1998). "Phase-I/II radio-immunotherapy study with Iodine-131-labeled anti-CEA monoclonal antibody F6 F(ab')₂ in patients with non-resectable liver metastases from colorectal cancer." Int J Cancer **75**(4): 615-9.
- Yip, G. W., M. Smollich, et al.** (2006). "Therapeutic value of glycosaminoglycans in cancer." Mol Cancer Ther **5**(9): 2139-48.
- Yokota, T., D. E. Milenic, et al.** (1992). "Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms." Cancer Res **52**(12): 3402-8.
- Zalutsky, M. R.** (2005). "Current status of therapy of solid tumors: brain tumor therapy." J Nucl Med **46 Suppl 1**: 151S-6S.

- Zalutsky, M. R. and D. D. Bigner** (1996). "Radioimmunotherapy with alpha-particle emitting radioimmunoconjugates." Acta Oncol **35**(3): 373-9.
- Zalutsky, M. R., R. E. McLendon, et al.** (1994). "Radioimmunotherapy of neoplastic meningitis in rats using an alpha-particle-emitting immunoconjugate." Cancer Res **54**(17): 4719-25.
- Zalutsky, M. R., J. M. Schuster, et al.** (1996). "Two approaches for enhancing radioimmunotherapy: alpha emitters and hyperthermia." Recent Results Cancer Res **141**: 101-22.
- Zalutsky, M. R., M. G. Stabin, et al.** (1997). "Tissue distribution and radiation dosimetry of astatine-211-labeled chimeric 81C6, an alpha-particle-emitting immunoconjugate." Nucl Med Biol **24**(3): 255-61.
- Zalutsky, M. R. and G. Vaidyanathan** (2000). "Astatine-211-labeled radiotherapeutics: an emerging approach to targeted alpha-particle radiotherapy." Curr Pharm Des **6**(14): 1433-55.
- Zalutsky, M. R., X. G. Zhao, et al.** (2001). "High-level production of alpha-particle-emitting (211)At and preparation of (211)At-labeled antibodies for clinical use." J Nucl Med **42**(10): 1508-15.
- Zalutsky, M. R., D. A. Reardon, et al.** (2007). "Targeted alpha-particle radiotherapy with 211At-labeled monoclonal antibodies." Nucl Med Biol **34**(7): 779-85.
- Zalutsky, M. R., D. A. Reardon, et al.** (2008). "Clinical experience with alpha-particle emitting 211At: treatment of recurrent brain tumor patients with 211At-labeled chimeric antitenascin monoclonal antibody 81C6." J Nucl Med **49**(1): 30-8.
- Zhang, M., Z. Yao, et al.** (2002). "Pretargeting radioimmunotherapy of a murine model of adult T-cell leukemia with the alpha-emitting radionuclide, bismuth 213." Blood **100**(1): 208-16.
- Zhang, M., Z. Zhang, et al.** (2003). "Pretarget radiotherapy with an anti-CD25 antibody-streptavidin fusion protein was effective in therapy of leukemia/lymphoma xenografts." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 1891-5.
- Zhang, M., Z. Yao, et al.** (2006). "The anti-CD25 monoclonal antibody 7G7/B6, armed with the alpha-emitter 211At, provides effective radioimmunotherapy for a murine model of leukemia." Cancer Res **66**(16): 8227-32.
- Zinzani, P. L., F. d'Amore, et al.** (2008). "Consensus conference: implementing treatment recommendations on yttrium-90 immunotherapy in clinical practice - report of European workshop." Eur J Cancer **44**(3): 366-73.

Annexe

Voir thèse papier

RESUMÉ :**Ciblage du syndecan-1 dans un modèle de xénogreffe de carcinome mammaire en radioimmunothérapie alpha et bêta**

La Radioimmunothérapie (RIT) a pour principe de vectoriser des radioéléments à la surface des cellules cancéreuses afin de les détruire. Dans la plupart des cas, les vecteurs utilisés sont des anticorps spécifiques d'antigènes tumoraux. L'utilisation de radioéléments présentant des caractéristiques physiques distinctes permet d'adapter le traitement à chaque type de tumeurs. Ainsi, les rayonnements bêta (β), de faible énergie mais possédant un long rayon d'action, sont adaptés à l'irradiation de masses tumorales. En revanche, les rayonnements alpha (α), très énergétiques, mais dont le parcours est limité, seraient mieux appropriés pour le traitement de cellules isolées ou de micrométastases. Dans ce cadre, nous avons développé un modèle murin de cancer du sein afin d'évaluer la pertinence de la RIT bêta dans cette pathologie, en ciblant le syndecan-1 couplé à l' ^{131}I . Cet antigène est surexprimé par les cellules myéloïdes et par de nombreux types de tumeurs solides, dont le carcinome mammaire, pour lequel il est associé à un mauvais pronostic. Nous avons montré l'efficacité du ciblage du syndecan-1 en RIT β , avec une régression du volume tumoral. Par ailleurs, bien que la structure en tumeur solide soit peu favorable à un traitement en alpha, nous avons montré qu'il était possible d'obtenir la régression de tumeur mammaire par cette technique, en utilisant le Bismuth 213, ceci indépendamment de la spécificité de l'anticorps utilisé. Cette régression semble essentiellement due à une atteinte de la néo-vascularisation tumorale. Nous avons donc cherché à valider cette hypothèse sur ce modèle en ciblant spécifiquement les néo-vaisseaux tumoraux en RIT alpha.

Mots clés : cancer du sein, radioimmunothérapie, syndecan-1, anticorps monoclonal, néo-vascularisation

ABSTRACT :**Title Syndecan-1 targeting in a breast carcinoma xenograft model in alpha and beta radioimmunotherapy**

Radioimmunotherapy has for principle to target the surface of cancer cells to destroy them. In most of the cases, the used vectors are specific antibodies of tumoral antigens. The use of radionuclides presenting different physical characteristics allow to adapt the treatment to every type of tumors. So, beta particles (β), of weak energy, possess a long scope and are adapted to the irradiation of bulky tumors. On the other hand, the alpha particles (α), very energetic, of which is limited, would be better suited for the treatment of isolated cells or micrometastasis. In this frame, we developed a murine model of breast cancer to estimate the relevance β particles, in this pathology, by targeting syndecan-1 (CD138) associated with Iodine 131. This antigen is over expressed on multiple myeloma cells and on several carcinomas including breast, prostate, colon, renal cell and hepatocellular carcinoma. In breast carcinomas the over expression of syndecan-1 correlates with poor prognosis and an aggressive phenotype. We showed the efficiency of the targeting syndecan-1 in radioimmunotherapy β , with a regression of the tumoral volume. Besides, although the structure of solid tumor is little favorable to the treatment in RIT alpha, we showed that it was possible to obtain the regression of mammary tumor by this technique, using Bismuth 213, this independently of the specificity of the used antibody. This regression seems essentially due to the tumoral neo-vascularization targeting. We thus tried to validate this hypothesis or this model by targeting specifically the tumoral neo-vessels in RIT alpha.

Key words : Breast cancer, radioimmunothérapie, syndecan-1, monoclonal antibody, neo-vascularization

**RUELLAN Anne-Lise
Institut de Recherche Thérapeutique
8, quai Moncousu
44007 NANTES Cédex1**