

UNIVERSITÉ DE NANTES  
FACULTÉ DE MÉDECINE

---

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ

Année 2014

# Traitement des tumeurs solides par radioimmunothérapie alpha sur modèles murins : ciblage de l'angiogénèse et intérêt d'une immunostimulation

---

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie  
Spécialité : Cancérologie

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**Laëtitia COULAIS Ép. DORSO**

*Le 5 février 2014, devant le jury ci-dessous*

Président	Pr. Jean-Marie BACH
Rapporteurs	Pr. Jean-Jacques FONTAINE Dr. Jean-Pierre POUGET
Examineurs	Pr. Jean-Marie BACH Pr. Hervé WATIER

*Directeur de thèse : François DAVODEAU  
Co-encadrant de thèse : Jérôme ABADIE*



# Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du CRCNA (Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers), sous la direction de Monsieur le Docteur Jacques Le Pendu.

Sa réalisation a été possible grâce au financement de la Région Pays de la Loire, dans le cadre du projet NucSan (Nucléaire pour la Santé).

A Monsieur le Professeur Jean-Jacques Fontaine et à Monsieur le Docteur Jean-Pierre Pouget, Qui ont eu la gentillesse d'accepter la lourde tâche de rapporteurs, qu'ils trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Jean-Marie Bach et à Monsieur le Professeur Hervé Watier, Tous mes sincères remerciements pour le temps qu'ils m'ont accordé en acceptant de participer à ce jury.

A Monsieur le Docteur Jacques Barbet, Directeur de Recherche CNRS, qui m'a accueillie au sein de l'équipe 13 « Recherche en Oncologie Nucléaire », Inserm UMR 892 CNRS UMR 6299 du CRCNA, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail ainsi que pour ses conseils avisés.

A Monsieur le Professeur Michel Chérel, co-responsable de l'équipe 13, qui m'a permis d'intégrer cette équipe. En remerciement de sa bienveillante attention, qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude.

A Monsieur le Docteur François Davodeau, Chargé de Recherche Inserm, qui a encadré ce projet durant ces trois années et m'a fait confiance pour sa réalisation. Tous mes sincères remerciements pour l'intérêt porté à ce travail et pour les nombreuses discussions fructueuses que nous avons échangées.

A Monsieur le Dr Jérôme Abadie, Maître de Conférences en anatomie pathologique, qui a accepté de co-encadrer de travail. Mes chaleureux remerciements pour ton soutien et ta patience tout au long de ces dix dernières années. Je souhaite que ce travail ne constitue pas seulement un aboutissement mais qu'il se prolonge par de nombreux autres projets communs.

Je tiens particulièrement à remercier :

Catherine Maurel, pour le partage de son expérience en expérimentation animale, ses conseils précieux, son aide indispensable et sa bonne humeur,

Sébastien Gouard, pour sa patience indéfectible, sa compétence technique et son dévouement professionnel,

Maxime Berthaud, pour son aide quotidienne et son soutien dans les bons comme dans les mauvais jours,

Joëlle Gaschet et Yannick Guilloux, pour les discussions enrichissantes que nous avons eues,

Maya Diab, Jean-Baptiste Gorin, Etienne Matous et Jérémie Ménager, pour tous ces moments (et musique) partagés, pour leur écoute et leur soutien.

Bonne route à vous tous, en espérant croiser vos chemins de temps à autre,

Marie-Hélène Gaugler et Stéphanie Olivo, pour leur appui logistique et leur bonne humeur contagieuse,

A ma famille de cœur d'Oniris, Frédérique Nguyen, Catherine Guéreaud, Florence Lezin, Sophie Lancien et Bernard Fernandez, pour leur aide technique et leur amitié. Que nos liens collaboratifs et amicaux se poursuivent dans de nouveaux projets,

A tous les membres de l'équipe UMR 892, de l'animalerie (Sandrine Minault), de la plateforme de cytométrie Cytocell (Juliette Desfrancois-Noël), de la plateforme de protéines recombinantes Impact (Karine Bernardeau et Klarà Echasserieau), du plateau de radioactivité (Agnès de France) et du secrétariat qui ont, chacun à leur manière, apporté une pierre à l'élaboration de ce travail.

Soyez assurés de ma reconnaissance et de ma sympathie.

Enfin, je dédie cette thèse :

A Joannick, pour ses encouragements dans cette grande aventure, pour son amour et sa compréhension au cours de ces (13) longues années d'études,

A Gabriel, ma plus grande fierté et mon réconfort,

A mes parents, pour cet amour inconditionnel qui les caractérise, leur soutien contre vents et marées. Que vous puissiez trouver dans cet aboutissement le résultat de tous vos efforts, avec toute ma tendresse filiale,

A tous mes amis, qui vont me demander si enfin, c'est la fin de mes études et auxquels je répondrai « Pas sûr... », merci d'avoir toujours été là quand j'avais besoin de vous pour un café ou un repas salvateur en période de doutes.

*Tout ce que tu feras sera dérisoire, mais il est essentiel que tu le fasses.*

*Gandhi*

*Les doutes, c'est ce que nous avons de plus intime.*

*Albert Camus*

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>PREMIÈRE PARTIE : RADIOTHÉRAPIE ALPHA (BISMUTH 213) : PRINCIPE, APPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES ET TOXICITÉ</b>	<b>3</b>
<b>I- PRINCIPES GÉNÉRAUX DE LA RADIOIMMUNOTHÉRAPIE</b>	<b>3</b>
<i>A- Introduction</i>	3
<i>B- Les différents types de vecteurs</i>	4
1- Les peptides	4
2- Les anticorps	5
3- Les fragments Fab'2	6
<i>C- Caractéristiques physiques et particularités des radioémetteurs alpha</i>	6
1- Des radiations de haute énergie	6
2- Un parcours court	6
3- Un transfert d'énergie linéique élevé	7
4- Notion de micro-dosimétrie	8
<i>D- Intérêt du bismuth 213</i>	9
1- Thérapies utilisant le bismuth 213	9
2- Obtention du bismuth 213	11
3- Obtention du radioimmunoconjugué	13
<i>E- Toxicité des particules alpha</i>	14
1- Une forte cytotoxicité	14
2- Une toxicité hématologique et rénale	15
<b>II- ÉTUDE EXPÉRIMENTALE : DÉTERMINATION DE LA TOXICITÉ À LONG TERME DU BISMUTH 213</b>	<b>17</b>
<i>A- Toxicité du bismuth 213 : données bibliographiques</i>	17
<i>B- Article 1</i>	23
<b>III- CONCLUSIONS DE LA PREMIÈRE PARTIE</b>	<b>57</b>
<b>DEUXIÈME PARTIE : RADIOIMMUNOTHÉRAPIE ALPHA ET CIBLAGE DE L'ENDOTHÉLIUM TUMORAL</b>	<b>63</b>
<b>I- PARTICULARITÉS DE LA VASCULARISATION TUMORALE</b>	<b>63</b>
<i>A- Rôle de la néovascularisation lors du processus tumoral</i>	63
1- Néovascularisation et établissement de la tumeur	63
2- Néovascularisation et pronostic	64
<i>B- Caractéristiques des vaisseaux tumoraux</i>	64
1- Classification des vaisseaux tumoraux	64
2- Modifications du flux sanguin intratumoral	65
3- Conséquences sur les cellules tumorales	67
<i>C- Mécanismes de l'angiogénèse tumorale</i>	68
1- Description du processus d'angiogénèse	68
2- Mécanismes moléculaires gouvernant l'angiogénèse	72
a- La famille VEGF et ses récepteurs	72
VEGF	72
Récepteurs au VEGF	72
b- Les angiopoïétines et le récepteur Tie-2	73
c- Les récepteurs Eph et les éphrines	73
d- Les intégrines	74

## **II- CIBLAGE DE LA VASCULARISATION TUMORALE DANS LES THÉRAPIES ANTICANCÉREUSES** \_\_\_\_\_ **75**

<i>A- Les inhibiteurs naturels de l'angiogénèse</i> _____	<b>75</b>
1- Angiostatine _____	75
2- Endostatine _____	76
3- Thrombospondine-1 _____	76
4- Inhibition de la dégradation de la matrice extracellulaire _____	76
<i>B- Ciblage spécifique de l'angiogénèse</i> _____	<b>76</b>
1- Ciblage des peptides pro-angiogéniques _____	76
2- Ciblage des récepteurs tyrosine-kinases _____	77
3- Ciblage des molécules d'adhésion _____	78
4- Limites des thérapies antiangiogéniques _____	78
<i>C- Intérêts du ciblage de l'endothélium tumoral</i> _____	<b>79</b>
1- Accessibilité _____	79
2- Amplification _____	79
3- Stabilité génétique _____	80
4- Thérapie non spécifique _____	80
5- Pertinence du ciblage de l'endothélium tumoral _____	81
a- Couplage d'une immunotoxine à un anticorps _____	81
b- Couplage du facteur tissulaire à un anticorps _____	81
c- Couplage d'un radionucléide à un anticorps _____	82

## **III- INTÉRÊTS DU CIBLAGE DU CD105** \_\_\_\_\_ **85**

<i>A- Caractéristiques et expression du CD105</i> _____	<b>85</b>
<i>B- Expression physiologique et pathologique du CD105</i> _____	<b>88</b>
1- Démonstration du rôle du CD105 dans l'homéostasie vasculaire _____	88
2- Expression du CD105 dans les tissus humains adultes normaux et tumoraux _____	89
3- Comparaison avec des marqueurs vasculaires classiques (CD31 et facteur de Von Willebrand) _____	90
<i>C- Application des anticorps anti-CD105 en cancérologie</i> _____	<b>92</b>
1- Anticorps anti-CD105 et pronostic _____	92
2- Anticorps anti-CD105 et imagerie _____	93
3- Anticorps CD105 et thérapie anticancéreuse _____	94
4- Mécanismes d'action des anticorps anti-CD105 _____	96

## **IV- EXPRESSION DU CD105 ET INTÉRÊT DU CIBLAGE ENDOTHÉLIAL PAR LA RADIOIMMUNOTHÉRAPIE ALPHA DANS UN MODÈLE MURIN DE CANCER DU SEIN** \_\_\_\_\_ **99**

<i>A- Objectifs de travail</i> _____	<b>99</b>
<i>B- Article 2</i> _____	<b>100</b>

## **V- CONCLUSIONS DE LA DEUXIÈME PARTIE** \_\_\_\_\_ **127**

## **TROISIÈME PARTIE : RADIOIMMUNOTHÉRAPIE ALPHA ET IMMUNOMODULATION** \_\_\_\_\_ **129**

### **I- INTRODUCTION** \_\_\_\_\_ **130**

<i>A- Acteurs de la réponse immunitaire antitumorale</i> _____	<b>130</b>
1- Lymphocytes T _____	130
a- Lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> (helper) _____	131
Les lymphocytes Th1 _____	131
Les lymphocytes Th2 _____	131
Les lymphocytes Th17 _____	132
Les lymphocytes T régulateurs _____	132
b- Lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> (cytotoxiques) _____	132
2- Cellules dendritiques _____	134
3- Cellules NK (Natural Killer) _____	135
a- Caractéristiques des cellules NK _____	135
b- Activation des cellules NK _____	136
c- NK et immunité antitumorale _____	137
<i>B- Intérêt et rôle in vivo de Flt3-ligand</i> _____	<b>138</b>

1- Cellules productrices de Flt3 ligand	139
2- Cellules cibles du Flt3 ligand	139
3- Effets cellulaires du Flt3 ligand	140
a- Effet sur les progéniteurs hématopoïétiques	140
b- Effet sur les leucocytes sanguins	140
c- Effet sur les cellules dendritiques	140
d- Effet sur les cellules NK	141
4- Flt3 ligand et myélotoxicité	143
5- Effet antitumoral du Flt3 ligand	143
6- Flt3- ligand et effet abscopal	146

## **II- ÉTUDE EXPÉRIMENTALE : POTENTIALISATION DE L'EFFET DE LA RADIOIMMUNOTHÉRAPIE ALPHA GRÂCE À L'IMMUNOSTIMULATION PAR LE FLT3-LIGAND, ÉTUDE DANS UN MODÈLE MURIN DE MYÉLOME MULTIPLE** **149**

<i>A- Le myélome multiple chez l'homme</i>	149
<i>B- Modèle de myélome multiple syngénique et immunocompétent : injection de cellules 5T33 chez les souris KaLwRij</i>	150
<i>C- Matériel et méthodes</i>	151
1- Caractérisation histologique et immunohistochimique des lésions observées chez les souris greffées avec des cellules 5T33	152
2- Production du Flt3-ligand	153
a- Purification du Flt3 ligand	154
b- Contrôle qualité du Flt3 ligand	156
3- Production des anticorps déplétants	157
a- Production des anticorps déplétants	157
b- Purification des anticorps déplétants	158
c- Cytométrie sur leucocytes et splénocytes	161
4- Préparation de l'anticorps anti-CD138	161
5- Protocole de RIT alpha ( <sup>213</sup> Bi-CD138) associée au traitement par le Flt3-ligand	162
6- Protocole de RIT alpha ( <sup>213</sup> Bi-CD138) associée au traitement par le Flt3-ligand et à l'administration d'anticorps déplétants	163
7- Analyses statistiques	164
<i>D- Résultats</i>	164
1- Phénotype clinique du modèle murin de greffe de cellules 5T33 dans les souris KaLwRij	164
a- Localisation des cellules tumorales	164
b- Lésions macroscopiques observées	165
c- Lésions histologiques observées	167
2- Contrôle des propriétés fonctionnelles du Flt3 ligand	172
a- Contrôle de l'efficacité <i>in vitro</i> du Flt3-L	172
b- Contrôle de l'efficacité <i>in vivo</i> du Flt3-L	173
Effet du Flt3-L sur le poids de la rate	173
Effet du Flt3-ligand sur les lymphocytes sanguins et spléniques	173
Effet du Flt3-ligand sur les DC et NK sanguines et spléniques	175
3- Vérification des déplétions sélectives	180
a-Vérification de la déplétion NK	181
b-Vérification de la déplétion CD4	181
c- Vérification de la déplétion CD8	182
4- Association de la RIT alpha ( <sup>213</sup> Bi-CD138) et du Flt3-L dans ce modèle	183
5- Détermination des populations immunitaires impliquées	184
a- Ré-administration	184
b- Effet des déplétions sélectives et du Flt3-L sur la progression du myélome multiple	186
<i>E- Discussion</i>	189

<b>III- CONCLUSIONS DE LA TROISIÈME PARTIE</b>	<b>193</b>
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE</b>	<b>195</b>
<b>PERSPECTIVES</b>	<b>199</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>201</b>



# LISTE DES ABREVIATIONS

ADCC : Antibody dependent cell cytotoxicity  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
aFGF : Acidic fibroblast growth factor  
ALAT : Alanine aminotransférase  
ANG-1 : Angiotensine-1  
ANG-2 : Angiotensine-2  
APC : Allophycocyanine  
ARN : Acide ribonucléique  
ASAT : Aspartate aminotransférase  
ATCC : American type culture collection  
bFGF : Basic fibroblast growth factor  
BSA : Bovine serum albumin  
CDC : Complement cell cytotoxicity  
CHO : Chinese hamster ovary  
CHX-A''-DTPA : Acide transcyclohexyldiéthylènetriamine pentaacétique  
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité  
DAMP : Danger associated molecular pattern  
DC : Cellule dendritique  
ECM : Extracellular matrix  
EDTA : Éthylène diamine tétraacétique  
ELISA : Enzyme-linked immuno-sorbent assay)  
ERK : Extracellular signal-regulated kinase  
FcRn : Récepteur Fc néonatal  
FDA : Food and drug administration  
FITC : Fluorescein isothiocyanate  
Flt3-L : Fms-like tyrosine kinase ligand  
 $\gamma$ GT : Gamma glutamyl transférase  
GBq : Giga Becquerel  
GM-CSF : Granulocyte macrophage colony-stimulating factor  
HEM : Hématopoïèse extramédullaire  
HES : Hémalun éosine safran  
HIF-1 $\alpha$  : Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$   
HRE : Hypoxia responsive element  
HSP : Heat shock protein  
HUVEC : Human umbilical vein endothelial cell  
ICIN : Inclusion cytoplasmique intra-nucléaire  
IFCC : International federation of clinical chemistry  
IGF : Insulin growth factor  
IHC : Immunohistochimie  
IL : Interleukine  
IP : Intra-péritonéal  
IRCU : International commission on radiation units  
ITU : Institut des transuraniens  
IV : Intraveineuse  
JNK : c-Jun N-terminal kinase  
MAPK : Mitogen-activated protein kinase  
MBq : Méga Becquerel  
MCSP : Melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan  
MIRD : Medical internal radiation dose committee  
MMP : Matrix metalloproteinase  
MS : Médiane de survie  
NK : Natural killer  
NL : Nœud lymphatique  
NRP-1 : Neuropilin-1  
PAI : Plasminogen activator inhibitor  
PAL : Phosphatase alcaline  
PAMP : Pathogen-associated molecular pattern

PAS : Periodic acid Schiff  
PBS : Phosphate buffered saline  
PDGF : Platelet derived growth factor  
PE : Phycoerythrin  
PECAM-1 : Platelet endothelial cell adhesion molecule-1  
PerCP : Peridinin chlorophyll protein  
PI : Post-injection  
PIGF : Placental growth factor  
PRR : Pattern recognition receptor  
PSA : Prostate specific antigen  
PSMA : Prostate specific membrane antigen  
RIT : Radioimmunothérapie  
SCID : Severe combined immunodeficiency  
SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  
TEL : Transfert d'énergie linéique  
TGF $\beta$ 1 : Transforming growth factor  $\beta$ 1  
TIMP : Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase  
TLR : Toll like receptor  
TM : Trichrome de Masson  
T $\beta$ R-II : Transforming growth factor  $\beta$  receptor II  
uPA : Urokinase plasminogen activator  
UV : Ultra-violet  
VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule-1  
VEGF : Vascular endothelial growth factor  
VEGFR : Vascular endothelial growth factor receptor  
vWF : Von Willebrand factor  
ZP : Zona pellucida

# TABLES DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Schéma simplifié de la structure d'une immunoglobuline.....	5
Figure 2 : Comparaison des parcours et du transfert d'énergie linéique des particules $\alpha$ et $\beta$ .....	7
Figure 3 : Génération de $^{213}\text{Bi}$ à partir d'un générateur $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ .....	12
Figure 4 : Ultrastructure des différents types de capillaires sanguins .....	58
Figure 5 : Irradiation des hépatocytes à partir du volume sanguin.....	60
Figure 6 : Comparaison structurale entre vaisseaux normaux et tumoraux.....	66
Figure 7 : Comparaison des cellules murales d'une artériole, d'un capillaire et d'une veinule avec un vaisseau intratumoral présentant des péricytes anormaux .....	67
Figure 8 : Étapes consécutives de l'angiogénèse bourgeonnante.....	69
Figure 9 : Différents modes de formation de vaisseaux sanguins tumoraux .....	71
Figure 10 : Angiogénèse par intussusception.....	71
Figure 11 : Interactions entre les ligands de la famille du VEGF et leurs récepteurs respectifs .....	74
Figure 12 : Aspect macroscopique de tumeurs sous-cutanées chez les souris traitées avec une immunotoxine dirigée contre la vascularisation tumorale .....	81
Figure 13: Évolution des cellules tumorales après injection du coaguligand.....	82
Figure 14 : Représentation schématique de la protéine CD105 de l'homme.....	86
Figure 15 : Rôle du CD105 dans la voie de signalisation TGF $\beta$ au sein des cellules endothéliales .....	87
Figure 16 : Intérêts du CD105 en cancérologie.....	92
Figure 17 : Mécanismes d'action des anticorps anti-CD105 : ADCC et CDC .....	97
Figure 18 : Contrôle des cellules tumorales par le système immunitaire .....	133
Figure 19 : Importance des DC dans le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative lors de la réponse antitumorale.....	134
Figure 20 : Action des NK selon le niveau d'expression du CMH de classe I sur la cellule cible.....	137
Figure 21 : Action des NK selon le niveau d'expression de ligands activateurs sur la cellule cible.....	137
Figure 22 : Cinétique des variations numériques induites par un traitement de 10 jours consécutifs avec 10 $\mu\text{g}$ de Flt3-L/injection sur les DC dans différents organes chez la souris.....	141
Figure 23 : Cinétique des variations numériques induites par un traitement de 10 jours consécutifs avec 10 $\mu\text{g}$ de Flt3-L/injection sur les cellules NK dans différents organes chez la souris .....	142
Figure 24 : Activités biologiques du Flt3-L <i>in vivo</i> .....	145
Figure 25 : Modélisation du rôle des radiations ionisantes dans la promotion de la présentation croisée des antigènes associés à la tumeur et dans l'activation des lymphocytes T antitumoraux.....	146
Figure 26 : Mise en évidence d'un effet absopal spécifique suite au traitement conjugué RIT + Flt3-L .....	148
Figure 27 : Schéma thérapeutique du myélome multiple chez l'homme .....	149
Figure 28 : Mécanismes d'action du thalidomide et du bortezomib dans le cadre du traitement du myélome multiple chez l'homme .....	150
Figure 29 : Production du Flt3-L en système eucaryote (CHO) .....	154
Figure 30 : Différentes étapes de purification du Flt3-L.....	154
Figure 31 : Résultat après passage sur la colonne phase inverse.....	156
Figure 32 : Contrôle de pureté du Flt3-L sur colonne S200.....	156
Figure 33 : Contrôle de pureté du Flt3-L par SDS-PAGE .....	157
Figure 34 : Profils d'éluion des anticorps déplétants .....	159
Figure 35 : Contrôle de pureté des anticorps déplétants.....	160
Figure 36: Estimation de l'immunoréactivité de l'anticorps natif comparé à l'anticorps couplé.....	162
Figure 37 : Protocole d'administration du Flt3-L .....	162
Figure 38 : Protocole de RIT $^{213}\text{Bi}$ -CD138 (activité injectée de 3.7 MBq) couplée aux déplétions sélectives et au Flt3-L.....	163
Figure 39 : Radiographie témoignant de l'absence d'ostéolyse dans le modèle murin 5T33 .....	164
Figure 40 : Incidence des lésions macroscopiques observées (n=51 souris).....	166
Figure 41 : Vérification de l'expression du CD138 murin sur les cellules 5T33 avant injection aux souris .....	168
Figure 42 : Résultat du test d'efficacité du Flt3-L <i>in vitro</i> : test de prolifération cellulaire en thymidine tritiée.....	172
Figure 43 : Effet du Flt3-L sur le poids de la rate (en mg selon les conditions) .....	173
Figure 44 : Effet du Flt3-L sur les lymphocytes sanguins.....	174
Figure 45 : Influence du Flt3-L sur les lymphocytes T du sang (en pourcentage des cellules CD3 $^{+}$ ).....	174
Figure 46 : Effet du Flt3-L sur les lymphocytes spléniques.....	175
Figure 47 : Influence du traitement au Flt3-L sur les DC et les NK du sang .....	176

Figure 48 : Influence du Flt3-L sur les DC (CD11c <sup>+</sup> ) et les cellules NK (NK1.1 <sup>+</sup> ) du sang (pourcentage des cellules CD45 <sup>+</sup> ) .....	177
Figure 49 : Influence du traitement au Flt3-L sur les DC et les NK de la rate .....	178
Figure 50 : Effet du Flt3-L sur les DC (CD11c <sup>+</sup> ) et les cellules NK (NK1.1 <sup>+</sup> ) de la rate (pourcentage des cellules CD45 <sup>+</sup> ) .....	179
Figure 51 : Évaluation de l'efficacité de l'anticorps anti-NK sur les cellules NK du sang et de la rate (en pourcentage des cellules CD45 <sup>+</sup> ) .....	181
Figure 52 : Évaluation de l'efficacité de l'anticorps anti-CD4 sur les lymphocytes du sang et de la rate (en pourcentage des cellules CD3 <sup>+</sup> ) .....	181
Figure 53 : Évaluation de l'efficacité de l'anticorps anti-CD8 sur les lymphocytes du sang et de la rate (en pourcentage des cellules CD3 <sup>+</sup> ) .....	182
Figure 54 : Étude de l'effet du Flt3-L couplé à la RIT $\alpha$ anti-CD138- <sup>213</sup> Bi sur la survie des souris .....	183
Figure 55 : Pourcentage de survie des souris avant ré-administration .....	184
Figure 56 : Pourcentage de survie des souris survivantes après ré-administration de 5T33 en IV .....	185
Figure 57 : Pourcentage de survie des souris greffées avec 5T33 et sélectivement déplétées .....	186
Figure 58 : Pourcentage de survie des souris greffées avec 5T33, traitées au Flt3-L et sélectivement déplétées .....	186
Figure 59 : Pourcentage de survie des souris greffées avec 5T33, traitées au Flt3-L non déplétées .....	187
Figure 60 : Pourcentage de survie des souris greffées avec 5T33, traitées au Flt3-L et sélectivement déplétées en NK .....	187
Figure 61 : Pourcentage de survie des souris greffées avec 5T33, traitées au Flt3-L et sélectivement déplétées en CD8 .....	188
Figure 62 : Pourcentage de survie des souris greffées avec 5T33, traitées au Flt3-L et sélectivement déplétées en CD4 .....	188
Tableau I : Récapitulatif des thérapies anticancéreuses utilisant le <sup>213</sup> Bi chez la souris .....	10
Tableau II : Essais cliniques utilisant le <sup>213</sup> Bi chez l'homme .....	10
Tableau III : Toxicité du <sup>213</sup> Bi injecté en IV .....	18
Tableau IV : Toxicité de <sup>213</sup> Bi injecté en IP .....	20
Tableau V : Toxicité de <sup>213</sup> Bi injecté en intratumoral .....	20
Tableau VI : Classification et propriétés des différents types de capillaires sanguins .....	59
Tableau VII : Rôles et récepteurs des différentes protéines de la famille VEGF .....	73
Tableau VIII : Expression du CD105 par les tissus humains normaux .....	89
Tableau IX : Caractéristiques et propriétés des marqueurs classiques de l'angiogénèse (CD31, vWF) comparées au CD105 .....	91
Tableau X : Méthodes d'obtention des différents anticorps anti-CD105 .....	94
Tableau XI : Principaux anticorps anti-CD105 utilisés en imagerie .....	94
Tableau XII : Études utilisant des anti-CD105 à visée thérapeutique .....	95
Tableau XIII : Immunohistochimie comparative CD31, vWF et CD105 sur les organes murins normaux .....	125
Tableau XIV : Modification du nombre absolu, des proportions et de l'activité des cellules NK (CD3 <sup>+</sup> NK1.1 <sup>+</sup> ) suite à 10 jours de traitement par le Flt3-L (10 $\mu$ g/j) chez la souris .....	142
Tableau XV : Activité antitumorale du Flt3-L dans les modèles murins .....	144
Tableau XVI : Caractéristiques épidémiologiques et phénotypiques du myélome chez l'homme et la souris .....	151
Tableau XVII : Coloration par l'Hemalun-Éosine-Safran (HES) .....	153
Tableau XVIII : Protocole d'IHC anti-CD138 murin .....	153
Tableau XIX : Caractéristiques des anticorps déplétants .....	158
Tableau XX : Conditions de culture des hybridomes .....	158
Tableau XXI : Caractéristiques des anticorps utilisés en cytométrie de flux .....	161
Tableau XXII : Lésions macroscopiques observées .....	165
Tableau XXIII : Caractérisation histopathologique et immunohistochimique du modèle 5T33 .....	169

## Introduction

La radioactivité alpha ( $\alpha$ ) fut d'abord décrite par Henri Becquerel en 1896 comme « des radiations invisibles émises par l'uranium » après l'observation du noircissement d'une plaque photographique mise en contact avec des cristaux d'uranium [137]. Ce rayonnement de type inconnu pouvait être dévié par des champs électriques et magnétiques. Le sens des déviations indiquait qu'il était transporté par des particules chargées positivement. Ernest Rutherford caractérisa, en 1908, les particules  $\alpha$  comme un noyau d'hélium composé de deux protons et de deux neutrons. Ce rayonnement est rapidement utilisé en thérapeutique, notamment dans la curiethérapie endocavitaire (cancers de l'utérus) ou interstitielle (cancers de la sphère oro-pharyngée) [137]. Dans les années 1950, le radium est progressivement remplacé par des isotopes artificiels (iridium 192 ( $^{192}\text{Ir}$ ), césium 137 ( $^{137}\text{Cs}$ ), cobalt 60 ( $^{60}\text{Co}$ ), iode 125 ( $^{125}\text{I}$ ), etc.). Par ailleurs, les deux dernières décennies ont vu se développer l'utilisation des anticorps monoclonaux en clinique. Dans le domaine de la médecine nucléaire, ces anticorps se sont imposés comme des vecteurs de choix pour déposer à la surface des cellules cibles des isotopes radioactifs, en vue d'une irradiation *in situ* spécifique [106]. La mise au point de nouvelles radiothérapies implique donc la caractérisation du radionucléide utilisé, du vecteur et l'évaluation de l'efficacité du couple radionucléide/vecteur.

Dans ce contexte, l'évaluation préclinique de la radioimmunothérapie (RIT) mérite d'être développée. Cette évaluation nécessite de répondre à plusieurs problématiques : celle de la toxicité sur les organes sains, celle du développement de cibles antigéniques pertinentes et adaptées au radionucléide utilisé et celle du développement de molécules susceptibles d'augmenter l'efficacité de la RIT, par exemple en stimulant le système immunitaire.

La première partie de ce travail vise à déterminer la toxicité à long terme suite à l'administration intraveineuse de bismuth 213 ( $^{213}\text{Bi}$ ), un radionucléide émetteur de particules  $\alpha$ .

Le vecteur qui lui a été couplé, dans la deuxième partie de ce travail, est un anticorps anti-CD105, ciblant les vaisseaux tumoraux. Le concept de thérapie ciblant la vascularisation tumorale a été proposé originellement par Folkman en 1971 et a été ensuite adopté et développé par Denekamp, dans les années 80, notamment comme thérapie adjuvante aux thérapies anticancéreuses traditionnelles [52]. Cette thérapie antivasculaire ciblée vise à détruire les cellules endothéliales intratumorales afin de priver les cellules tumorales d'oxygène et de nutriments. Il s'agit d'une approche différente des thérapies antiangiogéniques usuelles, qui elles, visent à empêcher la formation de nouveaux vaisseaux. La deuxième partie de ce travail a consisté en la caractérisation d'un anticorps anti-CD105 murin (le MJ7/18) par une étude de biodistribution et par une analyse immunohistochimique sur tissus murins normaux et tumoraux, afin d'établir la pertinence de son ciblage dans le cadre d'une radioimmunothérapie (RIT)  $\alpha$  dans un modèle de tumeur du sein triple négative xénogreffée chez la souris.

En plus de l'effet direct de la radioactivité sur les cellules tumorales, il est connu depuis la découverte de l'effet abscopal par Mole en 1953 que la radiothérapie peut avoir un effet bénéfique à distance du champ d'irradiation, notamment en stimulant le système immunitaire [50]. Nous nous proposons, dans une troisième partie d'étudier l'effet d'une cytokine stimulatrice, le Flt3 ligand, sur la réponse immunitaire engendrée par la RIT  $\alpha$  dans un modèle murin syngénique et immunocompétent de myélome multiple, grâce à l'anticorps anti-CD138 murin couplé au  $^{213}\text{Bi}$ .

## **Première partie : Radiothérapie alpha (bismuth 213) : principe, applications thérapeutiques et toxicité**

Le but est d'utiliser bismuth-213 ( $^{213}\text{Bi}$ ) comme radionucléide, couplé à des anticorps spécifiques, à visée thérapeutique. Cette stratégie repose sur différentes étapes successives :

- évaluer la toxicité intrinsèque du  $^{213}\text{Bi}$  couplé à des anticorps non spécifiques et à la BSA (Bovine Serum Albumin) chez la souris,
- établir une activité injectée maximum sans effets adverses, utilisable en RIT alpha dans des modèles murins.

### **I- Principes généraux de la radioimmunothérapie**

#### **A- Introduction**

Contrairement à la radiothérapie externe, dont l'administration est fractionnée, les activités intermittentes et les débits de dose (dose absorbée par unité de temps) élevés (60Gy/h), la radiothérapie interne vectorisée ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) est une irradiation continue, à bas débit de dose. La radiothérapie vectorisée utilise différents types de vecteurs (peptides, anticorps, fragments d'anticorps) reconnaissant les cellules cancéreuses et permettant d'acheminer des radionucléides vers la tumeur, afin de l'irradier spécifiquement et de la détruire. L'efficacité antitumorale et la toxicité du traitement sont conditionnées par :

- la biodistribution et la pharmacocinétique du radiopharmaceutique dans les tissus normaux et tumoraux,
- le type de rayonnement utilisé,  $\alpha$  ou  $\beta$ , les premiers permettant d'atteindre des cellules isolées (parcours de 50 à 80  $\mu\text{m}$ ) et les seconds s'avérant mieux adaptés au ciblage des masses tumorales (parcours de l'ordre du mm),
- la demi-vie physique du radionucléide et la demi-vie biologique du radiopharmaceutique.

La radiothérapie vectorisée est donc une forme de radioimmunothérapie (RIT) consistant à irradier les tumeurs malignes de manière ciblée grâce à l'injection systémique d'un vecteur couplé à un radionucléide. L'élément radioactif porté par le vecteur peut irradier *in situ*, à bas débit de dose, de façon ciblée et sélective un type cellulaire particulier (cellules tumorales ou cellules endothéliales dans le cas d'une RIT antivasculaire) [230]. L'administration systémique du vecteur couplé au radionucléide permet d'agir à la fois sur la tumeur primaire, mais également sur ses métastases. Le couplage d'un radionucléide à son vecteur est donc une modalité thérapeutique originale associant le potentiel tumoricide du vecteur (notamment d'un anticorps) à celui d'un radionucléide.

Les effets de la RIT, comme pour toutes les formes de radiothérapie interne, dépendent également des propriétés physiques (nature, énergie, parcours et période physique) du radionucléide, déterminant les doses d'irradiation. Pour chaque tumeur, il est donc nécessaire de déterminer quels sont les vecteurs et les radionucléides les mieux adaptés pour obtenir une efficacité antitumorale optimale avec une toxicité associée acceptable du radiopharmaceutique circulant. En effet, la spécificité du vecteur permet une irradiation maximale des cellules tumorales, tout en diminuant la toxicité au niveau des cellules normales, non ciblées par le vecteur.

## **B- Les différents types de vecteurs**

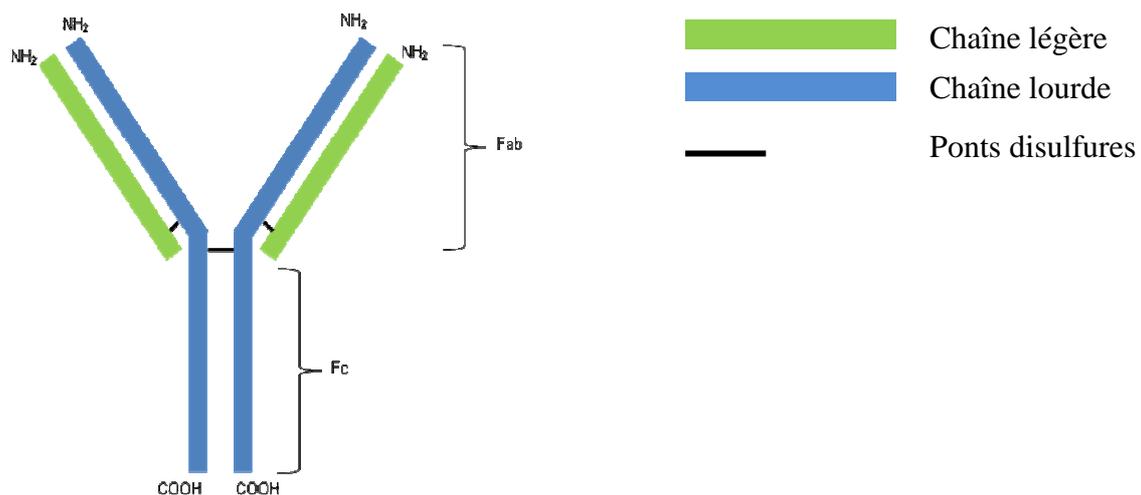
### **1- Les peptides**

Les principaux peptides utilisés dans le cadre d'une RIT chez l'homme sont des analogues de la somatostatine. Les récepteurs membranaires pour la somatostatine sont fortement exprimés par les tumeurs neuroendocrines. L'utilisation d'analogues peptidiques couplés à un radionucléide permet d'irradier sélectivement les cellules tumorales suite à l'internalisation du complexe radiopeptide/récepteur. Outre la somatostatine, les différents peptides faisant actuellement l'objet d'études précliniques ou de phase I sont les analogues de la cholécystokinine (cancer médullaire de la thyroïde), de la

bombésine (adénocarcinome prostatique) ou encore du récepteur Y1 au neuropeptide Y (carcinome mammaire). Ces peptides sont couplés avec des radioémetteurs  $\beta$  tels que l'yttrium-90 ou le lutétium-177 [49].

## 2- Les anticorps

Les immunoglobulines sont des anticorps associant deux chaînes lourdes et deux chaînes légères. Elles sont composées de deux parties, aux caractéristiques structurales et fonctionnelles distinctes. Une première partie  $\text{NH}_2$  terminale, porteuse de la variabilité, est responsable de la liaison de l'anticorps avec l'antigène (région Fab pour fragment antigen binding). La deuxième partie est constante et est caractéristique de l'isotype (région Fc pour fragment cristallisable) (**Figure 1**).



**Figure 1 : Schéma simplifié de la structure d'une immunoglobuline**

La majorité des anticorps utilisée en RIT appartient à la classe des IgG. La région Fc est impliquée dans la fixation du complément ainsi que dans la liaison de l'anticorps aux cellules effectrices du système immunitaire (monocytes, macrophages, lymphocytes, granulocytes neutrophiles, cellules NK) par l'intermédiaire du récepteur FcR. Certaines autres cellules (cellules endothéliales, intestinales et rénales) possèdent également un récepteur au fragment Fc des immunoglobulines appelé FcR néonatal (ou FcRn). La liaison de l'IgG à ce récepteur participe notamment au recyclage des IgG et prolonge leur demi-vie biologique [126]. Les IgG présentent une bonne stabilité dans le sérum,

une cinétique de distribution lente et une pénétration faible dans les tissus, du fait de leur haut poids moléculaire (155 kDa). Toutes ces propriétés des immunoglobulines doivent être prises en compte afin d'optimiser la RIT.

### **3- Les fragments Fab'2**

Les fragments Fab'2 sont générés à partir d'anticorps entiers soumis à une digestion par la pepsine. Ces fragments sont dépourvus de fragment Fc ce qui diminue la fixation non spécifique des anticorps au FcR présent sur de nombreuses cellules effectrices du système immunitaire et au FcRn. Leur taille inférieure à celle d'une immunoglobuline plus (100 kDa) leur assure une meilleure pénétration au sein des tissus. Cependant, leur demi-vie est plus courte et leur élimination rénale est rapide [179].

## **C- Caractéristiques physiques et particularités des radioémetteurs alpha**

### **1- Des radiations de haute énergie**

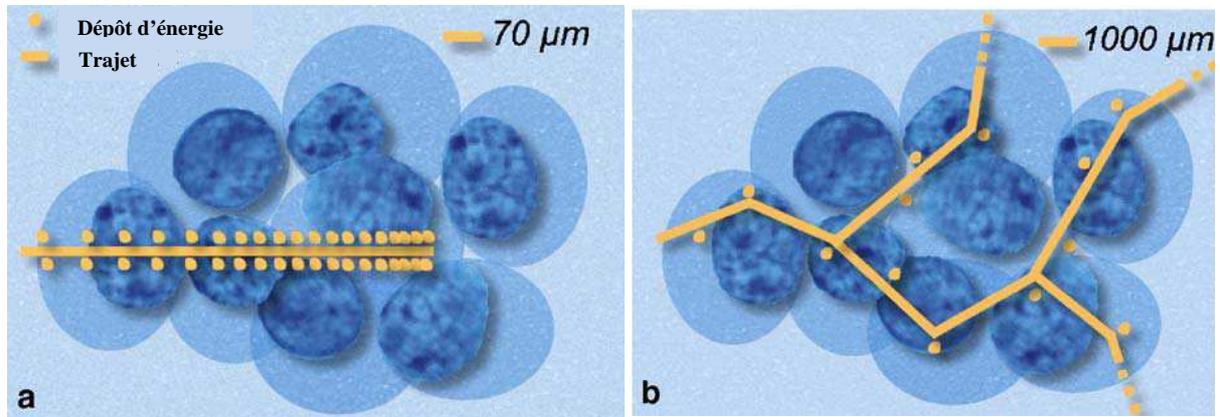
La désintégration  $\alpha$  consiste en l'association de deux protons et de deux neutrons pour former un noyau d'hélium ( $^4\text{He}$ ) qui est expulsé, constituant le rayonnement  $\alpha$ . Ce rayonnement ionisant est dit particulaire et est hautement énergétique (4 à 9 MeV).

Les rayonnements  $\beta$  sont caractérisés par l'émission d'électrons (particules  $\beta^-$ ) ou de positons (particules  $\beta^+$ ). Les rayonnements  $\gamma$  sont de nature électromagnétique et non particulaire (photons). À titre de comparaison, les rayonnements  $\beta$  ont une énergie de 10 keV à 3 MeV et les rayonnements  $\gamma$  de 60 keV à 3 MeV [140].

### **2- Un parcours court**

Les rayonnements  $\alpha$  ont un faible rayon d'action, de l'ordre de 5 cm dans l'air et de 70  $\mu\text{m}$  dans l'eau et les tissus mous (**Figure 2**). À titre comparatif, les particules  $\beta$  ont un parcours de l'ordre de 1 mm. Cette propriété leur confère une action ciblée et sélective. Le diamètre des vaisseaux intratumoraux est de l'ordre

de 5 à 100  $\mu\text{m}$  ; les rayonnements  $\alpha$  représentent donc des candidats attractifs pour l'irradiation des cellules endothéliales à partir du torrent circulatoire [1].



**Figure 2 : Comparaison des parcours et du transfert d'énergie linéique des particules  $\alpha$  et  $\beta$**   
(a) Parcours court des particules  $\alpha$ , de l'ordre de quelques diamètres cellulaires, comparativement au parcours plus long des particules  $\beta$  (b) (d'après [44]).

### 3- Un transfert d'énergie linéique élevé

Le transfert d'énergie linéique (TEL) correspond à la quantité d'énergie moyenne transférée par les particules à la matière par unité de longueur de la trajectoire de la particule. Les particules  $\alpha$  ont une trajectoire pratiquement rectiligne et très courte du fait de leur masse élevée. Le TEL des émetteurs  $\alpha$  est élevé (60-230 keV/ $\mu\text{m}$ ) en raison d'un dépôt d'énergie important sur un parcours limité (50 à 80  $\mu\text{m}$ ). Les rayonnements  $\beta$  ont une énergie faible et voyagent sur une plus longue distance (supérieure à 1 mm) ; leur TEL est donc moindre (0.1 à 1 keV/ $\mu\text{m}$ ). La désintégration  $\alpha$  permet ainsi de délivrer une plus grande quantité d'énergie dans un volume réduit, ce qui confère à ce type d'irradiation une plus grande cytotoxicité, à nombre de désintégration équivalent [230]. La densité des ionisations responsables des lésions cellulaires est forte sur le parcours des particules  $\alpha$ . En effet, il suffit d'une seule particule  $\alpha$  par cellule tumorale (au lieu de 3500 particules  $\beta$ ) pour délivrer une dose qui détruit 63% des cellules tumorales [165].

#### **4- Notion de micro-dosimétrie**

Les concepts dosimétriques, appliqués en radiothérapie externe et fondés sur une distribution homogène, à haut débit de dose et limitée dans le temps de fractions parfaitement définies d'énergie, ne sont pas transposables à la RIT  $\alpha$ . La RIT  $\alpha$  agit par une irradiation délivrée en continu, à bas débit de dose, à partir d'une source répartie de façon hétérogène dans la tumeur et à une concentration qui reste difficile à quantifier : le calcul de la dose délivrée en grays (joules/kg) est notamment problématique et ne saurait s'appliquer à l'échelle cellulaire. Cependant, la connaissance précise de la biodistribution des éléments radioactifs est un préalable indispensable au calcul de la dose. La dosimétrie traditionnelle emploie une méthode recommandée par le MIRD (Medical Internal Radiation Dose Committee), qui par la suite, a été adoptée par l'IRCU (International Commission on Radiation Units). Cette méthode ne prend pas en compte l'énergie déposée à l'échelle cellulaire, mais plutôt une dose moyenne par organe et est basée sur l'hypothèse d'une source de radiation homogène, ce qui n'est pas le cas des radiations  $\alpha$  [98]. La solution serait non pas de travailler avec les notions habituellement utilisées de dosimétrie, mais de développer des modèles capables de rendre compte des effets des rayonnements  $\alpha$  à l'échelle cellulaire. Ces modèles de micro-dosimétrie prennent en compte la variabilité statistique de dépôts d'énergie stochastique dans les cellules et permettent d'étudier l'action des particules  $\alpha$  de haut TEL ayant un faible parcours dans la matière.

En conclusion, les rayonnements  $\alpha$ , de par leurs propriétés physiques (parcours court, TEL élevé et forte cytotoxicité), sont particulièrement adaptés à une RIT ciblant les vaisseaux et au ciblage de cellules tumorales isolées ou en petits amas (maladie résiduelle ou tumeurs hématopoïétiques (leucémies, myélome multiple)). Cependant, le calcul de dose par micro-dosimétrie est un véritable challenge.

## **D- Intérêt du bismuth 213**

Il existe approximativement une centaine de radionucléides émetteurs  $\alpha$ , pour la plupart des noyaux lourds de numéro atomique supérieur à 82, mais seuls quelques-uns sont disponibles pour une utilisation clinique éventuelle avec une période assez courte pour être compatible avec des applications *in vivo* [27]. Les radionucléides très énergétiques (8 MeV) et de durée de vie courte (comme le  $^{213}\text{Bi}$  et l'astate-211 ( $^{211}\text{At}$ )), sont particulièrement adaptés au ciblage cellulaire. Actuellement, peu d'applications cliniques utilisent la RIT  $\alpha$  : l'essentiel de la littérature internationale concerne des approches précliniques (**Tableau I**). Cela s'explique notamment par la faible disponibilité et le coût élevé des radioémetteurs  $\alpha$ .

### **1- Thérapies utilisant le bismuth 213**

De nombreuses thérapies ont été menées en utilisant des anticorps couplés au  $^{213}\text{Bi}$  dans des modèles murins xénogreffés. Le  $^{213}\text{Bi}$  a également été utilisé, couplé à un anticorps anti-CD45, comme conditionnement préalable à une greffe de moelle osseuse chez le chien [184]. Chez l'homme, une étude de Jurcic a porté sur des essais de RIT de la leucémie myéloïde aiguë, grâce à un anticorps anti-CD33 couplé au  $^{213}\text{Bi}$  [106].

L'efficacité de la RIT utilisant le  $^{213}\text{Bi}$  a été démontrée dans de nombreuses études précliniques sur modèles murins, portant sur des cancers différents : cancer du sein, du pancréas, du colon, de la prostate, de l'ovaire, de la trachée, du poumon, de l'estomac, mélanome, lymphome ou encore leucémies (**Tableau I**).

En clinique chez l'homme, la première étude a été réalisée par l'équipe de Jurcic en 2002, au centre anticancéreux du Memorial de Sloan-Kettering (New-York). Cette étude incluait 18 patients atteints d'une leucémie myéloïde aiguë ou d'une leucémie myélomonocytaire chronique réfractaire ou ayant récidivé. Le traitement proposé était constitué d'un anticorps anti-CD33 (HuM195) couplé au  $^{213}\text{Bi}$ , injecté par voie intraveineuse.

Tableau I : Récapitulatif des thérapies anticancéreuses utilisant le  $^{213}\text{Bi}$  chez la souris

Anticorps	Application	Résultat	Référence
<b>201B</b>	Carcinomes mammaire, trachéal, épidermoïde Adénocarcinome pulmonaire	Diminution de la taille des micrométastases pulmonaires Augmentation de la médiane de survie	[110, 111, 112]
<b>C30.6 CO17-1A (anti CD326)</b>	Carcinome colorectal	Inhibition de la croissance tumorale Augmentation de la médiane de survie	[16]
<b>Anti-CD25</b>	Leucémie à cellules T	Augmentation de la médiane de survie	[231]
<b>J591 (anti PSMA)</b>	Carcinome prostatique	Ralentissement de la croissance tumorale Augmentation de la médiane de survie Réduction du taux de PSA	[141]
<b>C595 (anti-MUC1) MX35</b>	Carcinome ovarien	Diminution de la croissance des métastases Augmentation de la médiane de survie	[89, 196]
<b>TES-23 (anti-CD44H)</b>	Carcinome trachéal	Ralentissement de la croissance tumorale	[112]
<b>Anti-CD74</b>	Lymphome B	Ralentissement de la croissance tumorale Augmentation de la médiane de survie	[144]
<b>Trastuzumab (anti-HER2)</b>	Métastases péritonéales (cancer du colon/pancréas)	Augmentation de la médiane de survie	[145]
<b>9.2.27 (anti-MCSP)</b>	Mélanome	Ralentissement de la croissance tumorale	[174]
<b>Anti Lewis Y humanisé</b>	Cancer du sein	Ralentissement de la croissance tumorale	[109]
<b>PAI-2</b>	Cancer du pancréas métastatique	Ralentissement de la croissance tumorale Augmentation de la médiane de survie	[170]
<b>Anti-HER2 (7.16.4)</b>	Métastases de cancer du sein	Augmentation de la médiane de survie	[197]
<b>d9 Mab (anti E-cadhérine)</b>	Cancer gastrique	Augmentation de la médiane de survie	[188]
<b>103A</b>	Leucémie érythroïde	Augmentation de la médiane de survie	[100]
<b>B3</b>	Carcinome épidermoïde	Augmentation de la médiane de survie	[228]
<b>Anti-CD20</b>	Lymphome non hodgkinien	Augmentation de la médiane de survie	[162]

Tableau II : Essais cliniques utilisant le  $^{213}\text{Bi}$  chez l'homme

Anticorps	Application	Résultat	Référence
<b>9.2.27</b>	Mélanome	22 patients traités, 1 rémission complète, 3 réponses partielles, 11 stabilisations	[172]
<b>HuM195 (anti-CD33)</b>	Leucémie myéloïde	18 patients traités, 15 réductions de blastes médullaires	[106]
		31 patients traités, 31 réductions de blastes médullaires	[178]
<b>Substance P</b>	Glioblastome	5 patients traités, 2 améliorations de l'index de Barthel	[42, 114]

Lors de cette étude, une escalade de dose a été effectuée, en injections multiples, correspondant à une activité totale injectée comprise entre 602 et 3515 MBq. Si une réduction des blastes circulants a été observée chez 78% des patients traités et une réduction des blastes médullaires a été constatée chez 93% des patients, aucune rémission complète n'a été constatée [106].

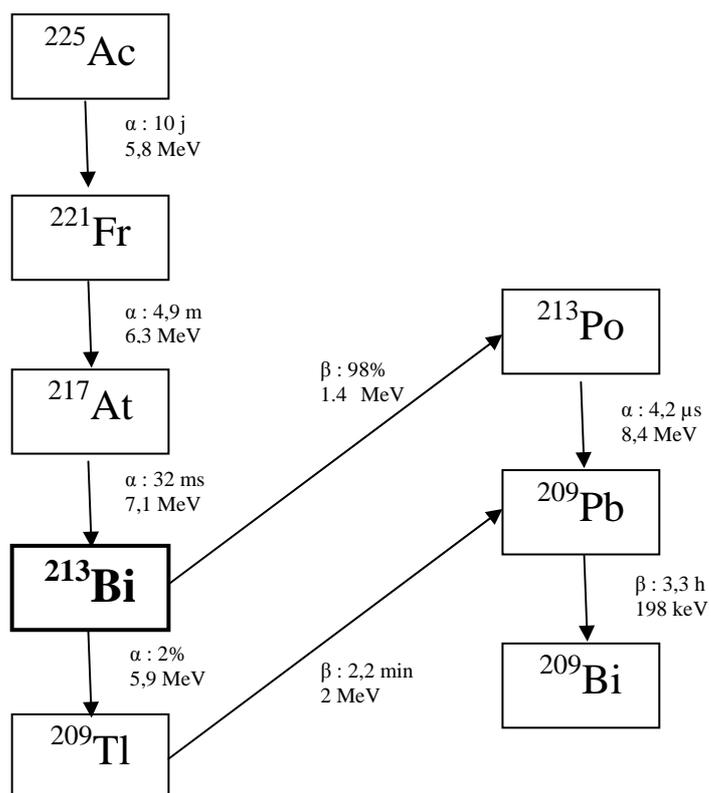
Une deuxième étude utilisant ce même radioimmunoconjugué après un traitement par la cytarabine a été conduite par la même équipe en 2010. Les 31 patients inclus présentaient une leucémie myéloïde aiguë réfractaire ou ayant récidivé. Cette étude montre une réduction des blastes circulants chez 100% des patients ainsi qu'une réduction supérieure à 20% des blastes médullaires chez 77% des patients [178]. L'escalade de dose comprenait des doses comprises entre 18.5 et 46.25 MBq/kg, en 2 à 4 injections de 518 à 1262 MBq chacune, correspondant à une activité totale injectée comprise entre 1195 et 4755 MBq.

Les autres études utilisant un anticorps couplé au  $^{213}\text{Bi}$  ont utilisé une voie d'administration intralésionnelle et non systémique, contrairement aux deux précédentes. Il s'agit d'une étude de l'équipe d'Allen, portant sur le traitement des mélanomes par un anticorps dirigé contre le MCSP (Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan) [172] et d'une étude de l'équipe de Merlo, portant sur le traitement des glioblastomes par de la substance P radiomarquée au  $^{213}\text{Bi}$  [42, 114] (**Tableau II**).

## **2- Obtention du bismuth 213**

Le  $^{213}\text{Bi}$  est un produit de filiation de l'actinium-225 ( $^{225}\text{Ac}$ ) (**Figure 3**). Sa décroissance par émission de particules  $\alpha$  et  $\beta$  aboutit à l'obtention de l'élément stable  $^{209}\text{Bi}$ . Son utilisation est toutefois limitée par sa période courte (45.6 minutes) : 20% de l'émission  $\alpha$  totale du bismuth est réalisée dans les 15 premières minutes après l'injection. Trois heures post-injection, seulement 6% de l'émission  $\alpha$  totale persiste [140]. Il faut donc manipuler très rapidement, ce qui rend l'expérimentation difficile. Le  $^{213}\text{Bi}$  est élué à partir d'un générateur contenant de l' $^{225}\text{Ac}$  fixé à une résine d'AGMP-50 (Biorad). L' $^{225}\text{Ac}$  ayant une période de 10 jours, un générateur ne peut être utilisé qu'une quinzaine de jours pour obtenir des activités compatibles avec des expérimentations précliniques *in vivo*. Au-delà, les activités volumiques sont trop faibles pour permettre l'injection

d'une dose efficace aux souris. Après élution, le  $^{213}\text{Bi}$  est couplé à un anticorps spécifique à l'aide d'un chélate bifonctionnel, le CHX-A''-DTPA (acide transcyclohexyldiéthylènetriamine pentaacétique). Ce chélate forme une « cage » qui permet de capturer les métaux, ici le  $^{213}\text{Bi}$ , afin de le fixer sur l'anticorps d'intérêt. Le bismuth non couplé est ensuite éliminé par chromatographie ITLC-SG (Pall). L'anticorps radiomarqué est purifié sur une colonne PD10 puis filtré sur  $0.22\ \mu\text{m}$ .



**Figure 3 : Génération de  $^{213}\text{Bi}$  à partir d'un générateur  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$  (D'après [6])**

La période du  $^{213}\text{Bi}$  étant très courte, la décroissance de l'activité est donc prise en compte dans le temps nécessaire à l'injection de  $^{213}\text{Bi}$  couplé à l'anticorps d'intérêt. La quantité de  $^{213}\text{Bi}$  constitue le facteur limitant. Elle conditionne l'activité spécifique du radioimmunoconjugué ainsi que le volume injecté aux animaux, pour une activité préalablement définie. Au sein du générateur, un équilibre se crée entre le  $^{213}\text{Bi}$  issu de la décroissance de l'actinium et la décroissance de ce même  $^{213}\text{Bi}$ . Cet équilibre, appelé équilibre séculaire, est effectif en 2 heures, ce qui permet de faire une élution toutes les 2 heures, soit un

maximum de 6 éluions par jour. Chaque éluion permet l'injection de 10 à 12 souris. Pour une éluion donnée, les volumes sont ajustés en fonction du temps pour compenser la décroissance du radionucléide. Les essais sont donc effectués à activité constante pour un lot de souris donné, avec une variation des quantités d'anticorps injectées (5 à 10  $\mu\text{g}$  par souris). Les cellules endothéliales, directement en contact avec le flux sanguin, sont rapidement accessibles aux anticorps monoclonaux radiomarqués au  $^{213}\text{Bi}$  injectés en intraveineuse, ce qui est crucial au regard de la période physique brève de ce radionucléide.

### **3- Obtention du radioimmunoconjugué**

La stabilité *in vivo* du radioimmunoconjugué est un paramètre crucial, permettant d'optimiser l'irradiation ciblée des cellules tumorales tout en minimisant la toxicité aux tissus normaux. Compte-tenu de la nature métallique du bismuth, ce dernier est couplé à l'anticorps d'une manière indirecte, via un chélate. La première étape du couplage concerne donc l'adjonction d'un groupement prosthétique (molécule organique non protéique maintenue dans une structure protéique au moyen de liaisons covalentes permanentes ou de liaisons faibles) à l'anticorps. Le radiomarquage de l'anticorps est réalisé dans un second temps. Le groupement prosthétique est constitué d'un agent chélatant bifonctionnel activé permettant d'une part sa conjugaison à l'anticorps et d'autre part, la complexation avec le  $^{213}\text{Bi}$ . Dans le cadre de cette étude, c'est le CHX-A''-DTPA qui a été retenu [156]. La conjugaison de l'anticorps avec cet agent bifonctionnel permet la fixation de plusieurs agents chélatants par molécule d'anticorps. Le rendement de marquage est de l'ordre de 80 à 90% après 10 à 20 minutes de complexation. La procédure de marquage au  $^{213}\text{Bi}$  demande environ 30 min, ce qui reste compatible avec sa période de 45.6 minutes.

## **E- Toxicité des particules alpha**

### **1- Une forte cytotoxicité**

Nous l'avons vu précédemment, les particules  $\alpha$  émettent une grande quantité d'énergie sur un trajet très court, ce qui leur confère une très grande cytotoxicité. En effet, la mort cellulaire peut être obtenue avec 1 à 10 atomes radioactifs liés à la cellule cible [101]. Les radionucléides à TEL élevé ont en outre l'avantage d'avoir une efficacité biologique indépendante de l'oxygénation du tissu (hypoxique ou normoxique) et de la position des cellules dans le cycle cellulaire [27]. L'effet antitumoral des particules  $\alpha$  s'exerce donc sur la totalité des cellules tumorales, contrairement à certaines substances utilisées en chimiothérapie qui n'agissent que sur les cellules en cours de division. Les rayonnements  $\alpha$  produisent des lésions cellulaires caractérisées par des cassures double-brin de l'ADN, une surexpression de p53 et des réarrangements chromosomiques complexes [168]. La mort des cellules exposées aux rayonnements  $\alpha$  survient surtout lorsque les particules  $\alpha$  traversent le noyau (effet direct). Le taux maximum de cassures double-brin de l'ADN survient lorsque le transfert d'énergie linéique est compris entre 200 et 300 keV/ $\mu\text{m}$  ; en effet, la distance entre les ionisations causées par les radiations à ces TEL approche le diamètre de l'ADN double brin (2 nm), ce qui rend très probable la survenue d'une cassure double-brin [150]. Les lésions précoces de l'ADN sont, en effet, essentiellement directes et passent très peu par la radiolyse de l'eau et les radicaux peroxydes [216]. Ces dernières années, quelques équipes ont démontré l'existence d'un effet « bystander » ou effet non-ciblé, dans lequel des dommages sont exprimés dans les cellules voisines non irradiées à proximité d'une cellule ou de cellules irradiées [154, 169]. Cette toxicité différée est indirecte, attribuable à l'augmentation intracellulaire de dérivés réactifs de l'oxygène, occasionnant secondairement des lésions dues à un stress oxydatif, faisant partie de l'effet non-ciblé [125, 168].

## **2- Une toxicité hématologique et rénale**

La toxicité hématologique des émetteurs  $\alpha$  est surtout imputable à leur myélotoxicité. Les émetteurs  $\alpha$ , véhiculés par le sang, parviennent jusqu'à la moelle osseuse où ils touchent les progéniteurs hématopoïétiques. L'atteinte de ces progéniteurs se manifeste ensuite par la diminution des cellules filles de ces progéniteurs dans le torrent circulatoire (lymphopénie et thrombopénie notamment).

La toxicité rénale est plus ou moins marquée selon le radionucléide utilisé. À titre d'exemple, le bismuth est connu pour son accumulation dans le cortex rénal. Ceci est attribuable à la présence de protéines de la famille des métallothionéines dans le cytoplasme des néphrocytes du tube contourné proximal. Ces protéines ont la capacité de capter les métaux lourds (plomb, bismuth, etc.) [101]. La littérature actuelle ne fait état d'aucune étude portant sur la toxicité des radioémetteurs  $\alpha$  sur d'autres organes.



## **II- Étude expérimentale : détermination de la toxicité à long terme du bismuth 213**

### **A- Toxicité du bismuth 213 : données bibliographiques**

Le  $^{213}\text{Bi}$  présente une période courte, néanmoins, ce radionucléide émetteur de particule  $\alpha$  possède une cytotoxicité importante, qu'il convient de prendre en compte et de quantifier, préalablement à son utilisation thérapeutique. De nombreuses études portant sur la RIT à base de  $^{213}\text{Bi}$  ont évalué sa toxicité à court ou moyen terme. Ces évaluations portaient le plus souvent sur la toxicité hématologique et parfois, sur la toxicité rénale ou hépatique (**Tableaux III, IV et V**). La toxicité à long terme des radioémetteurs  $\alpha$  reste donc largement méconnue [12]. Lors de l'injection IV (intraveineuse) d'un radioimmunoconjugué (Fab'2 anti-CD326, à l'activité de 25.9 MBq), aucune toxicité rénale n'est notée à 18 semaines [16]. Cependant une toxicité rénale à 20 semaines est mise en évidence après une injection IP (intra-péritonéale) d'une activité de 22.2 MBq de  $^{213}\text{Bi}$ -d9Mab (anticorps monoclonal anti E-cadhérine). Cette toxicité rénale se manifeste par une hyalinisation progressive des glomérules et par une fibrose associée à une hydronéphrose et à une atrophie tubulaire. Cependant, ces lésions ne sont pas observées avec une activité de 1.85 MBq, qui démontre par ailleurs une efficacité thérapeutique [15]. Une diminution transitoire des leucocytes et des thrombocytes est néanmoins notée à 15 jours. Aucune myélotoxicité à long terme n'a pu être démontrée chez des souris nude, préalablement greffées en IP avec une lignée cellulaire de cancer gastrique humaine (HSC45-M2) et traitées en IP avec du  $^{213}\text{Bi}$  couplé au d9Mab. Si le taux de leucocytes sanguins diminue de 32%, 3 jours après un traitement par une activité de 22.2 MBq, les valeurs retrouvent leur niveau d'origine à environ 20 jours après traitement [188]. Alors que Nikula ne reporte aucune toxicité hépatique à 4 semaines avec une activité de 13 MBq, Park met en évidence une légère augmentation des transaminases (ASAT et ALAT) à 17 semaines avec une activité de 22.2 MBq [157, 162] (**Tableau III, IV et V**).

**Tableau III : Toxicité du  $^{213}\text{Bi}$  injecté en IV**

Activité $^{213}\text{Bi}$	Vecteur	Cible thérapeutique	Néphrotoxicité	Hépatotoxicité	Hématotoxicité	Suivi	Référence
26 MBq Souris	Fab'2	CD326	Pas d'augmentation de l'urémie	ND	Diminution marquée des leucocytes et thrombocytes (15 jours) Retour aux valeurs normales à 5 semaines	18 semaines	[16]
7.4, 22.2, 29.6 MBq Souris	Protéine de fusion	CD20	Pas d'augmentation de l'urémie, ni de la créatininémie	Légère élévation des transaminases à 22.2 MBq	Absence d'hématotoxicité	17 semaines	[162]
5.7 MBq x 5 et 8.5 MBq x 5 Souris	Facteur de coagulation	uPA	ND	ND	Absence d'hématotoxicité	13 semaines	[175]
1.96, 3.52, 6.92, 13 MBq Souris	Anticorps	CD33	Absence d'augmentation de l'urémie, de la créatininémie, de l'albuminémie	Absence d'augmentation des PAL, de la bilirubine, des $\gamma\text{GT}$	Diminution marquée du nombre de leucocytes à J7 (6.92 et 13 MBq)	4 semaines	[157]
3.7, 7.4, 11.1 MBq Souris	Anticorps	CD138	Légère augmentation transitoire de la créatininémie, à 7.4 MBq	Augmentation des ALAT et des ASAT à partir de J50 à 7.4 MBq	Diminution marquée des leucocytes, thrombocytes et érythrocytes (6 jours) Retour aux valeurs normales à 5 semaines	21 semaines	[39]
1.85 MBq Souris	Anticorps	CD45	Pas d'augmentation de l'urémie, ni de la créatininémie	Augmentation des ALAT et des ASAT la première semaine, réversible	Absence de modification de la numération-formule sanguine	8 semaines	[153]
9.25-18.5 MBq Souris	Anticorps	CD25	Augmentation de l'urémie entre 2 et 5 semaines à 18.5 MBq Pas d'augmentation de la créatininémie	Pas d'augmentation des ASAT et des ALAT	Diminution des thrombocytes à J7 à 18,5 MBq Retour aux valeurs normales en 2-3 semaines	16 semaines	[231]

**Tableau III : Toxicité du  $^{213}\text{Bi}$  injecté en IV (suite)**

Activité $^{213}\text{Bi}$	Vecteur	Cible thérapeutique	Néphrotoxicité	Hépatotoxicité	Hématotoxicité	Suivi	Référence
37 MBq Souris	Biotine		Néphropathie radioinduite, nécrose tubulaire Légère augmentation de l'urémie Pas d'augmentation de la créatininémie	Nécrose hépatocytaire (1 souris sur 3) Pas d'augmentation des enzymes hépatiques	Lymphopénie à J7, retour aux valeurs normales à J28 Thrombocytopenie à J7, retour aux valeurs normales à J14	2 semaines	[228]
4.3, 9, 12.6 MBq Rat	Peptide	Analogue de la somatostatine	Légère néphrotoxicité	Absence de toxicité	Absence de toxicité	3 semaines	[159]
3.7-218 MBq/kg Chien	Anticorps anti-CD45	CD45	Absence de toxicité	Augmentation transitoires des ALAT, ASAT, PAL à 120 jours	Diminution des thrombocytes à J10 Retour aux valeurs normales en 5 semaines	43 semaines	[184]
10.36 - 37 MBq/kg en 3 à 7 injections Homme	Anticorps	CD33		Dysfonction hépatique pour 22% des patients	Myélosuppression de l'ensemble des patients mais retour aux valeurs usuelles en 22 jours	6 semaines	[106]
18.5, 27.75, 37, 46.25 MBq Homme	Anticorps	CD33	Augmentation de la créatininémie	Augmentation des ASAT, des ALAT à 37 MBq	Myélosuppression Thrombocytopenie	8 semaines	[178]
55-592 MBq Homme	Anticorps	Anti-MCSP	Absence de toxicité	ND	Absence de toxicité	48 semaines	[172]

**Tableau IV : Toxicité de  $^{213}\text{Bi}$  injecté en IP**

Activité $^{213}\text{Bi}$	Vecteur	Cible thérapeutique	Néphrotoxicité	Hépatotoxicité	Hématotoxicité	Suivi	Référence
3.7, 5.55, 7.4, 9.25 MBq Souris	Anticorps	18B7	ND	ND	Diminution marquée des thrombocytes à J7 Absence de fibrose pulmonaire	2 semaines (hématotoxicité) 20 semaines (poumon)	[45]
21.3, 28.41, 35.4 MBq Souris	Anticorps	MUC1	Cytomégalie observée à 35.4 MBq Légère néphropathie	ND	ND	21 semaines	[196]
10.5, 14.1, 17.7, 28.5, 42.6 MBq Souris	Peptide	PAI-2	Augmentation de l'urémie : x8 à 13 semaines et x23 à 40 semaines Néphropathie radioinduite : cytomégalie néphrocytaire, cylindres protéiques intratubulaires, dilatation de l'espace de Bowman, nécrose tubulaire	ND	Absence de toxicité	40 semaines	[1965]
0.37, 1.85, 7.4, 22.2 MBq Souris	Anticorps	d9-E cadhérine	Absence de toxicité à 1.85 MBq Hyalinisation glomérulaire progressive, fibrose, hydronéphrose et atrophie tubulaire, augmentation de l'urémie (22.2 MBq)	ASAT, PAL normales Pas de lésions histologiques	Diminution des leucocytes dose-dépendante dès J3 Retour à la normale à J20	6 semaines 21 semaines (lésions rénales) 43 semaines	[188] [15]

**Tableau V : Toxicité de  $^{213}\text{Bi}$  injecté en intratumoral**

Activité $^{213}\text{Bi}$	Vecteur	Cible thérapeutique	Néphrotoxicité	Hépatotoxicité	Hématotoxicité	Suivi	Référence
1.07-2 GBq Homme	Peptide	Substance P	Absence	Absence	Absence	8 semaines	[42]

Chez l'homme, le traitement des leucémies myéloïdes par l'anticorps anti-CD133 (HuM195) couplé au  $^{213}\text{Bi}$  occasionne des anomalies hépatiques chez 68% des patients (augmentation de la bilirubine, des phosphatases alcalines et des transaminases) à J7, durant 6 jours. Une myélosuppression (90% de neutropénie), une thrombocytopénie (100%) et une augmentation de la créatinine chez 35% des patients sont également rapportées [178]. Cependant, Jurcic décrit, pour le même anticorps mais pour des activités injectées plus faibles, des dysfonctions hépatiques pour seulement 22% des patients assorties d'une myélosuppression transitoire [106].

Ces études sont effectuées à court ou moyen terme et la toxicité n'est pas toujours évaluée concomitamment sur le rein, le foie et la moelle osseuse. Forts de ces études précédentes, nous nous proposons d'évaluer la toxicité hématologique, hépatique et rénale du  $^{213}\text{Bi}$  à long terme (300 jours).

Les taux plasmatiques de l'aspartate aminotransférase (AST) et de l'alanine aminotransférase (ALT) sont mesurés dans le sérum afin d'évaluer *in vivo* la fonction hépatique. L'AST est une enzyme mitochondriale présente dans les cellules du foie, du cœur, du muscle, du cerveau et du rein. Une lésion aiguë de ces cellules provoque une libération de cette enzyme conduisant à une augmentation de son taux plasmatique. L'ALT est une enzyme cytoplasmique, principalement présente dans les hépatocytes, les cardiomyocytes et les myocytes. Sa concentration est plus élevée dans le foie, c'est pourquoi son augmentation plasmatique s'avère plus spécifique d'une cytolysse hépatique que l'augmentation plasmatique de l'AST.

Les niveaux de créatinine et d'urée sont mesurés dans le sérum afin d'évaluer la fonction rénale. L'urée représente le produit final du métabolisme azoté. Son niveau sérique est un indicateur de l'apparition d'une dysfonction rénale. La créatinine est un produit de dégradation des protéines dans le muscle (créatine phosphate). Le niveau de créatinine sérique constitue un indicateur de la sévérité de l'atteinte rénale : cependant ce niveau n'augmente que lorsque la masse de néphron fonctionnelle est inférieure à 50%, il s'agit donc d'un indicateur tardif de dysfonction rénale.



## **B- Article 1**

### **LONG-TERM TOXICITY OF $^{213}\text{Bi}$ IN NUDE MICE**

Laëtitia Dorso <sup>1,2</sup>, Edith Bigot-Corbel <sup>1,3</sup>, Jérôme Abadie <sup>2</sup>, Sébastien Gouard <sup>1</sup>, Frank Bruchertseifer <sup>4</sup>, Alfred Morgenstern <sup>4</sup>, Catherine Maurel <sup>1</sup>, Michel Chérel <sup>1</sup>, François Davodeau <sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Nantes-Angers Cancer Research Center CRCNA, University of Nantes, INSERM UMR892, CNRS UMR6299, Nantes, France*

<sup>2</sup> *LUNAM University, Oniris, AMaROC Unit, Nantes, F-44307, France*

<sup>3</sup> *Biochemistry Department, Laënnec Hospital, 44093 Nantes, France*

<sup>4</sup> *European Commission, Joint Research Centre, Institute for Transuranium Elements, Karlsruhe, Germany*

Corresponding author:

François Davodeau, Inserm U892, CNRS UMR 6299, CRCNA, IRS-UN, 8 quai Moncoussu, BP 70721, 44007 Nantes Cedex 01

E-mail: [françois.davodeau@univ-nantes.fr](mailto:françois.davodeau@univ-nantes.fr)

**Abstract:**

**BACKGROUND:** Short-term toxicological evaluations have been reported for preclinical assays using alpha-radioimmunotherapy (RIT), particularly using Bismuth 213 ( $^{213}\text{Bi}$ ). In these reports, toxicity is greatly influenced by the pharmacokinetics and binding specificity of the vector. It is difficult to assess the non-specific irradiation toxicity due to the presence and persistence of the circulating radiopharmaceutical in the blood. To assess this we performed an acute and chronic toxicity study in mice using  $^{213}\text{Bi}$ -radiolabeled BSA (Bovine Serum Albumin) as a paragon of a long-term circulating vector.

**METHOD:** Biodistribution of BSA and of two non-specific antibodies were evaluated after intravascular administration, and the dose to organs for each vector radiolabeled with  $^{213}\text{Bi}$  was calculated. Groups of nude mice were injected with 3.7, 7.4 and 11.1 MBq of  $^{213}\text{Bi}$ -BSA and were followed-up for 385 days. Biochemical plasmatic parameters including alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), blood urea nitrogen (BUN) and creatinine were measured and blood cell counts (white blood cells, platelets and red blood cells) were performed. Histological examination of mouse organs was performed at different time points in the follow-up period.

**RESULTS:** Hematologic toxicity was transient and non-limiting for all evaluated activities since at the highest injected activity (11.1 MBq) mice died with liver and kidney failure but a normal blood cell count (median survival time of 189 days). This liver toxicity was objectified by an increase of both ALT and AST and by histological examination. Mice injected with 7.4 MBq had a median survival time of 324 days with increased plasma BUN and creatinine, due to impaired kidney function that was confirmed by histological examination. Injection of 3.7 MBq of radioactivity was safe, with no obvious plasma enzyme modifications nor significant histological abnormalities.

**CONCLUSION:** Hematologic toxicity was not a limiting feature in our study of the effects of a long-term circulating radiolabeled vector. We observed hepatic injury leading to liver failure in mice at the highest injected dose which are consistent with those clinical trials for which liver damage are observed in humans. For the intermediate injected activity, the benefit-risk balance should be evaluated because of the risk of long-term toxicity to kidney.

**Keywords:** 213-Bismuth, toxicity, mouse, radioimmunotherapy, alpha particles

## **Introduction**

Numerous bismuth- $^{213}$  ( $^{213}\text{Bi}$ ) toxicity studies have been performed in the course of preclinical radioimmunotherapy (RIT) assays [1]. Most of these toxicity evaluations are performed using short-term studies on tumor-bearing mice, and don't make possible the assessment of long-term effects of a systemic irradiation with  $^{213}\text{Bi}$  [2]. However, doses that effectively reduce tumors and show no acute toxicity to healthy organs could result in long-term tissue damage and functional organ failures [3]. The high LET (Linear Energy Transfer) and the short path of alpha particles (a few tenths of micron) enable tumor cell destruction with less than ten alpha tracks per cell [4]. These properties are suited to targeting small clusters of cells, isolated cells in hematologic pathologies, or for the treatment of micro metastasis in consolidation treatment. RIT with alpha particles is thus complementary to RIT with beta particles, whose millimetric path is better suited for bulky tumor treatment.

Contrary to external beam irradiation that delivers well-known homogenous irradiation doses to a defined organ volume, the dose delivered to healthy organs during alpha or beta RIT are much more difficult to estimate. Therefore the relationship between absorbed dose and toxicity remains a challenge for medical dosimetry [5]. For particles with a short path length, the energy deposit within an organ is not homogenous and depends on the sites of fixation of the radiolabeled vector within tissue ultrastructures [4, 6]. It is well known that RIT induces kidney failure, which is isotope and vector-dependent at equivalent doses to organs [4, 7]. Thus, the toxic effect of this irradiation depends firstly on the biodistribution of the radiolabeled vector, and secondly on the histological organ structure. For example, in the case of the liver hepatic cord, whose cell diameter is in the range of 40 microns, hepatocytes will be extensively irradiated from radiolabeled vector circulating in the blood capillary bordering them. The resulting crossfire effect leads to irradiation of the whole liver volume even without specific uptake of the radiolabeled vector on antigenic sites. Thus in RIT, the systemic injection of a radiopharmaceutical in the blood flow corresponds to a total body irradiation with variable doses and dose rates to each organ. The ionizing radiation effect on healthy organs needs to be evaluated with a means of global follow-up of organ function and confirmed by histological examination of irradiated tissues.

Toxicity is tightly related to the pharmacokinetics of the vector used for RIT. Given the short half-life of  $^{213}\text{Bi}$ , the use of small-size vectors such as radiolabeled peptides with fast pharmacokinetics for one step or pretargeted RIT approaches, or antibody fragment like Fab', enable delivery of high radiation doses to the tumor within the time of  $^{213}\text{Bi}$  decay [8, 9, 10].

The early clearance of this kind of vector from the blood limits their myelotoxicity. However, their elimination via the kidneys raises the possibility of renal toxicity that appears more than 10 weeks after treatment at infra-therapeutic doses [11]. Conversely, the use of larger vectors like antibodies or antibody fragments Fab'(2) to target tumors rapidly accessible to an effective blood supply limit kidney toxicity at the cost of a prolonged irradiation of hematopoietic bone marrow and healthy organs due to the serum stability of the vectors and their low extravasation rate during the time of  $^{213}\text{Bi}$  decay [2, 12].

The different kinds of vectors used in RIT, each with their own pharmacokinetics, have as a common denominator the irradiation of healthy organs from the vasculature volume since the geometry of this non-specific irradiation is comparable regardless of the vector used for RIT. The knowledge of an organs blood volume and flow characteristics enables the activity/toxicity relationship for vectors remaining in the blood flow like the macromolecules to be more clearly defined. The toxicity associated with each vector is due to the specific binding property and capability to diffuse into interstitial and intra cellular compartments, and can be deduced from total dose uptake subtracted from blood activity in the organ. To evaluate the activity in the blood volume of organs, we used  $^{213}\text{Bi}$  radiolabeled BSA as an example of a non specific vector. Indeed, BSA at around 66 KDa and 7 nm in diameter has a slow diffusion rate across the vascular endothelium during the time of  $^{213}\text{Bi}$  decay [13], and is limited by the pore size encountered in non-fenestrated capillaries. The size of BSA is beyond the limit of renal filtration, like Fab'(2) or IgG currently used in RIT, and results in its containment in the plasma volume. Therefore it is possible to evaluate with  $^{213}\text{Bi}$ -BSA the toxicity due to irradiation from the blood in an organ, contrarily to smaller vectors that rapidly accumulate in kidney due to their fast elimination by the renal route. BSA or non-specific mouse IgG coupled with  $^{213}\text{Bi}$  were injected intravenously into healthy nude mice, at increasing doses. Mice were followed-up during 385 days after injection. Blood-cell count, measurement of blood biochemical parameters and histopathological examination of organs were performed during this period in order to better understand acute and chronic alpha induced radiotoxicity.

## **Material and methods**

### Animals

NMRI-nu (nu/nu) female mice, weighting between 28.4 and 34.8 g and 7 to 8 weeks old, were purchased from Janvier®, Le Genest St Isle, France. Mice were housed under standard

conditions (standard diet and water *ad libitum*). All animal experimentation was carried in the laboratory animal facilities (approval number: B-44-279). Experiments performed in this study were approved by Ethics Committee for animal experiments - Région Pays de la Loire, France (license N°CEEA 2012 171 for biodistribution study, license N°CEEA 2013 2 for RIT study)

#### Radiolabeling/ Preparation and quality control of $^{213}\text{Bi}$ labeled immunoconjugates

BSA and non specific antibodies (OKT3 (IgG2 $\alpha$ κ, anti-hCD3, ATCC hybridoma (CRL-8001) or 6H4 (IgG1κ, anti-h $\beta$ 2m)) were modified with 2-(4-isothiocyanatobenzyl)-cyclohexyl-diethylenetriaminepenta-acetic acid (SCN-CHX-A''-DTPA, Macrocyclics) as previously described [14]. In brief, BSA was incubated with 20 equivalents (mol/ mol) CHX-A''-DTPA in carbonate buffer (0.05 M, pH 8.7) and, after overnight incubation at room temperature, purified by HPLC on a Sephadex G200 gel-filtration column (Amersham Biosciences, Saclay, France). Mean chelate number per antibody was 2, as assessed with 4 equivalents of a buffered citrate-acetate (0.02–0.15 M, pH 5.5)  $^{111}\text{In}$  solution. For labeling with  $^{213}\text{Bi}$ , the BSA- or antibodies-CHX-A''-DTPA were incubated with  $^{213}\text{Bi}$  eluted from a  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$  generator (Institute for Transuranium Elements, Karlsruhe, Germany) for 10 min in 0.8 M ammonium acetate (pH 5.3). The resulting  $^{213}\text{Bi}$ -labeled immunoconjugates were separated from unbound  $^{213}\text{Bi}$  by size-exclusion chromatography using a PD-10 column (GE Healthcare) [15]. Radiochemical purity, checked by ITLC-SG using 10% TCA as solvent, was greater than 95% [16].

The BSA and non specific OKT3 and 6HA antibody were labeled with  $^{125}\text{I}$  using the iodogen method [17]. The  $^{125}\text{I}$ -labeled BSA and antibodies were purified on a PD10 column (GE Healthcare). Radiolabeling efficiency, estimated by ITLC, was above 95%.

#### Biodistribution study and dosimetry

BSA, OKT3 and 6H4 antibodies were labeled with  $^{125}\text{I}$ -Iodine ( $^{125}\text{I}$ ) (PerkinElmer, Courtaboeuf, France) using the iodogen method [18]. The  $^{125}\text{I}$ -labeled immunoconjugates were purified on a PD10 column. Mice were given 5  $\mu\text{g}$  of  $^{125}\text{I}$ -labeled BSA, OKT3 or 6H4 antibodies via the caudal vein. Three mice were sacrificed at 5, 15, 45, 90 and 180 minutes after injection. Different organs were collected. The amount of radionuclide activity in tissues was measured by gamma scintillation counter in parallel with a standard of injected activity. The results were expressed as the mean percentage of injected dose per gram of tissue (%ID/g)  $\pm$  standard deviation (SD) and corrected by the application of the decay of  $^{213}\text{Bi}$ .

The doses to organs were calculated from biodistribution data obtained with  $^{125}\text{I}$ -labeled BSA, OKT3 or 6H4 corrected for the decay of  $^{213}\text{Bi}$ . The area under curve of biodistribution for each organs was calculated with Prism software (Graph Pad software, San Diego, CA) in order to determine the total number of Becquerel in each organ for the considered time period for an arbitrary injected dose of 1 MBq. The dose to the organs per injected MBq was calculated by multiplying the total number of Becquerel by the mean energy of alpha particles. Beta and gamma emissions were neglected.

### Clinical data

A single intravenous injection (caudal vein) was performed with increasing activities of  $^{213}\text{Bi}$ -BSA (control (n=5), 3.7 MBq (n=5), 7.4 MBq (n=7), 11.1 MBq (n=5)). Survival was monitored during 55 weeks and body weight was recorded weekly . Blood was collected by retro orbital puncture into EDTA tubes for hematologic parameters and into lithium-heparin tubes for biochemical parameters. Total white blood cells (WBC), red blood cells (RBC) and platelets counts were determined at the day of injection and at weekly interval thereafter during 35 days. The samples were counted on a MS9/5 vet hematology analyzer (Melet Schloesing laboratories, Osny, France). Biochemical parameters were measured on plasma after centrifugation of lithium-heparin blood samples. Blood urea nitrogen (BUN) and creatinine levels as well as aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) plasmatic activities were determined at the day of injection and at monthly intervals thereafter during 55 weeks on a Hitachi 917 Roche Analyzer (Meylan, France) using dedicated reagents. BUN was measured using the urease method, creatinine by creatininase method, and AST and ALT using the IFCC (International federation of clinical chemistry) method without pyridoxal phosphate. All biochemical parameters were expressed as the percentage  $\pm$  SD of the counts relative to baseline value (day 0 representing the day of the injection of  $^{213}\text{Bi}$ -BSA).

Survival curves were calculated using to the Kaplan-Meier method and compared using the log rank test. Body weight, AST, ALT, BUN and creatinine curves were compared using the Mann-Whitney test. All analyses were 2-sided. P values of 0.05 or less were considered significant. Theses analyses were performed using Prism.

### Histological examination of mouse organs

For histological examination, dedicated animals were sacrificed (26 weeks after injection for mice injected with 11.1 MBq and 35 weeks after injection for mice treated with 7.4 MBq).

Organs were fixed in 4% neutral-buffered formalin and processed by routine methods. Sections were stained with Hematoxylin-Eosin-Saffron (HES), Periodic Acid Schiff (PAS) and Masson's Trichrome (MT) and evaluated with a Nikon Eclipse 5DI light microscope by two certified veterinary pathologists (LD, JA). Age-matched non-injected mice served as controls for the comparison of normal microscopic features at each time point. Observed findings were graded as follows: 0 (absent), 1 (moderate), 2 (marked) and 3 (severe). Because of the number of animals, semi-quantitative variables (histological grade occurrence) of the different groups were compared using Fisher's exact test. P values  $\leq 0.05$  were considered significant. R (R development Core Team, Vienna, Austria) was used for the analysis.

## **Results**

### Pharmacokinetic and dosimetry

We performed a biodistribution study of BSA, OKT3 and 6H4 using  $^{125}\text{I}$ -radiolabeled BSA, OKT3 and 6H4 in order to evaluate toxicity in relation to the dose to organs. In the case of  $^{213}\text{Bi}$  whose half-life is 46 minutes, more than 93% of the activity has decayed three hours after injection. We applied the  $^{213}\text{Bi}$  decay to the biodistribution performed with  $^{125}\text{I}$ -BSA (Figure 1) in order to calculate the alpha dose to the organs (Table 1). The highest BSA activity was found in the blood, and the activities in the kidney, liver, spleen and bone followed a pharmacokinetic profile that paralleled that observed in the blood (Figure 2). On the contrary, BSA activities in stomach, heart, skin, intestine and muscle, displayed a different pharmacokinetic profile (Figure 3).

To measure the BSA content in blood and the interstitial volume, we compared the organ to blood dose ratio at different time points. This ratio gives insight into the distribution of radiolabeled vector between blood and interstitial compartments. Kidney, liver, spleen and bone display constant organ-to-blood dose ratio over the time of  $^{213}\text{Bi}$  decay. These results are consistent with the presence of sinusoids in the spleen, liver and bone marrow or fenestrated blood capillaries in the kidney that delimit a rapidly accessible interstitial compartment (Figure 2).

On the other hand, in muscle, heart, skin, intestine and stomach the organ-to-blood dose ratio progressively increased with time. These organs display variable permeability to macromolecules either because of loose junctions between endothelial cells in non-fenestrated capillaries, or the presence of fenestrated capillaries with a continuous basement membrane layer that limits diffusion or convection of macromolecules. In these organs the equilibrium

between the blood and the interstitial compartment is not reached during the time of  $^{213}\text{Bi}$  decay. The increase in the organ to blood dose ratio in these organs indicates that a continuous diffusion/convection of radiolabeled BSA from the blood to the organ occurs, possibly because of differences of macromolecule influx and efflux kinetics (Fig 3).

To validate the BSA model for antibody-related non-specific toxicity to organs, we compared biodistribution of BSA with those of two non-specific monoclonal antibodies, OKT3 and 6H4 (Table 1). The dose to organ was calculated for  $^{213}\text{Bi}$  labeled OKT3 and 6H4 and compared to  $^{213}\text{Bi}$ -BSA. The  $^{213}\text{Bi}$ -calculated doses to organ obtained with the non-specific antibodies are consistent with the doses calculated for  $^{213}\text{Bi}$ -BSA and are largely influenced by the blood dose. The comparison of organ-to-blood dose ratio between BSA and the two non-specific antibodies reveals differences in muscle, skin, intestine and stomach that could be related to a higher vascular permeability for BSA than for the antibodies, and is most likely due to its smaller size. One should note however, that the rapid decay of  $^{213}\text{Bi}$ , when applied to the biodistribution data, normalizes doses by minimizing pharmacokinetic differences which appeared with time between the BSA and non-specific antibodies.

#### Toxicity: survival and weight

Three groups of nude mice were injected with  $^{213}\text{Bi}$ -BSA at increasing activities: 3.7 MBq, 7.4 MBq, 11.1 MBq and a control group injected with PBS. The body weight and survival were followed-up over a 385-day period. In the 11.1 MBq treated group, all mice died between day 97 and day 221 with a median survival of 189 days. Five mice among seven injected with 7.4 MBq died between day 269 and day 357 with a median survival of 324 days. In the 3.7 MBq treated group one mouse died at day 165 and a second one at day 255. The median survival was not calculated for this group as three mice were still alive at the end of the follow-up period. All the mice in the control group survived up to the end of the follow-up period. Significant differences in survival were found between the control group and the 7.4 MBq ( $p=0.0062$ ), between the control group and the 11.1 MBq groups ( $p=0.0014$ ), between the 7.4 MBq group and the 11.1 MBq group ( $p=0.0005$ ) and between the 3.7 MBq group and the 11.1 MBq group ( $p=0.034$ ). No significant differences were found between the control group and the 3.7 MBq group, nor between the 3.7 MBq and the 7.4 MBq group (Figure 4).

The body weight curves can be subdivided into several phases. During the first 10 days all injected mice experienced a body weight loss less than or equal to 10% of the initial body weight. This first phase corresponded with acute and transient radiation toxicity since all mice recovered their initial weight between day 20 and 30 after injection, and continued to gain

weight until day 75. No significant differences were observed between injected and control groups at this date. A subsequent drop in weight was observed for all treated groups compared to control up to day 150. Thereafter, differences between treated groups began to appear. The weight curves of the 11.1 MBq group rapidly decreased concomitantly with the death of mice between day 97 and Day 221. The weight of mice treated with 7.4 and 3.7 MBq stabilized during this period below the level of the control animals. Likewise for the 11.1 MBq group, the weight of mice of the 7.4 MBq group dropped between day 300 and 350 during the period where death occurred. In the 3.7 MBq group the weight of mice normalized with that of the control group (Figure 5).

#### Hematologic toxicity

Hematotoxicity was assessed by counting WBC, RBC and platelets in mice treated with 0, 3.7, 7.4, and 11.1 MBq of  $^{213}\text{Bi}$ -radiolabeled BSA, OKT3 and 6H4. The data obtained the same day after injection for the three vectors were pooled and assigned to the mean absorbed dose to blood for the three vectors (Figure 6). Independent of the injected activity, hematologic toxicity appeared rapidly after injection and was transient.

As early as three days after injection, a drop in WBC was observed, with a nadir at day 7. WBCs decreased at 17.4%, 8.8% and 2.6% of the initial value (determined at day 0), for injected activities of 3.7, 7.4 and 11.1 MBq respectively. A return to the initial WBC numbers was observed at day 14 after injection for all the injected doses.

Platelet counts were stable between day 0 and day 3 in all groups. The nadir of the platelet count was reached at day 7 with 77.1%, 52.4% and 27.5% of the initial value, respectively for injected activities of 3.7, 7.4 and 11.1 MBq. A return to the initial number of platelets was observed at day 14 for 3.7 and 7.4 MBq injected activities and at day 24 for the 11.1 MBq group.

RBC counts remained unchanged for the 3.7 and 7.4 MBq groups but decreased to 72% of the initial value for the 11.1 MBq injected activity group at day 14, and returned to the initial value at day 24. This data indicates that even the 11.1 MBq-injected activity is not myeloablative and all the mice survived over the 90 day period after injection. Mice of the 11.1 MBq group died between day 97 and day 221 with numbers of WBC, platelets and RBC comparable to that before injection and of the control group indicating that toxicity to the red marrow is not limiting for a non-specific irradiation from the blood volume.

### Hepatic and renal biochemical parameter analysis

Plasmatic ALT and AST were measured to evaluate hepatic function. AST is a cytoplasmic and mitochondrial enzyme, which can be found in liver, heart, muscles, brain and kidney. ALT is a cytoplasmic enzyme, present mostly in liver, and in a lesser extent in the heart and muscles. Cytolysis and particularly hepatic cytolysis results in an increase in plasma levels of these enzymes, with a better correlation for ALT than AST. In mice injected with 11.1 MBq presenting an early death (before day 220), we observed an increase of AST (x3) and ALT (x5) starting at day 100 that continued to increase until death (x5 for AST and x10 for ALT) ( $p=0.0062$  for AST,  $p=0.0016$  for ALT). This indicates hepatocyte damage (necrosis or cytolysis) to the extent that ALT activity is higher than AST (Figure 7). For the two other groups we also observed from day 250 an increase of AST and ALT which was more pronounced and sustained in the 7.4 MBq group than in the 3.7 MBq group.

To evaluate kidney damage, BUN and Creatinine were measured. BUN represents the end product of nitrogen catabolism. Uremia is an indicator of kidney failure but is also influenced by endogen and exogen catabolism. Creatinine is constantly produced in muscle and is completely filtrated by the renal glomerules, without tubular reabsorption and/or secretion. Serum creatinine represents a good indicator of the severity of renal failure particularly of GFR (glomerular filtration rate) but its plasma level increases when the functional nephron mass is reduced with 50%. In the group of mice injected with 11.1 MBq a parallel increase of uremia and creatininemia was observed before death. However, this result must be tempered because the SD was very high, consistent with increased uremia and creatininemia only in some mice contrary to the mice of the 7.4 MBq group that all experienced a gradual and parallel increased creatininemia (x4) and uremia (x5) certifying a kidney failure (Figure 8) after day 250. In the 3.7 MBq group uremia and creatininemia remained low throughout the follow-up period indicating that this injected activity is safe for the kidney.

### Histological examination of the liver

The liver shows several microscopic changes due to toxicity such as extramedullary hematopoiesis (EMH), cellular atypias, isolated cellular necrosis, inflammation and fibrosis. All these findings are graded according to severity (Figure 9). In rodents, EMH is commonly encountered in the liver and in the spleen in physiological condition. In the liver it is characterized by groups of dozens of hematopoietic precursors localized in the space of Disse [19]. In our study EMH did not significantly increase in mice treated with activities over 3.7 MBq compared to control groups (Figure 10B), and thus does not appear to be a major

consequence of alpha irradiation in accordance with the limited myelotoxicity determined by blood cell enumeration. Activity-dependent increases of centrilobular fibrosis and periportal inflammatory cell infiltration indicated interstitial injury. There was statistically significant difference between control and mice injected with activities over 3.7 MBq ( $p=0.0415$ ). Isolated cellular necrosis was another indicator of hepatocyte injury. It is characterized by a small basophilic nucleus within a shrunken, acidophilic cytoplasm, often surrounded by a rim of degenerated neutrophils (Figure 10C). Although isolated necrosis seemed to be activity-dependent, no statistically significant difference could be found compared to the control groups. The incidence and severity of cellular atypias (cytomegaly, karyomegaly and intra-nuclear cytoplasmic invagination (INCI)) increased with injected activities. Cytomegaly is defined by the enlargement of the hepatocyte cytoplasm, consequent to an increase in the cytosolic protein content or number of organelles (e.g. smooth endoplasmic reticulum, peroxisomes, or mitochondria). Generally it is considered as an adaptive response to chemical stress and can lead to hepatocellular degeneration and necrosis. Karyomegaly is characterized by an increased size of hepatocyte nuclei, and correlates with hepatocyte polyploidy which occurs when there is duplication of nuclear material in the absence of cytokinesis (Figure 10D) [19]. These atypias are activity-dependant ( $p=0,007$ ). Intra-nuclear cytoplasmic invagination (INCI) corresponds to the protrusion of cytoplasm into an invagination of the hepatocyte nuclear membrane (Figure 10D). These atypias are common in the liver of aged mice, but in this study, there was a statistically significant difference between control and treated mice ( $p=0.0068$  for INCI between control group and group over 3.7 MBq). These atypias are thus a consequence of a radiation-induced process.

#### Histological examination of the kidney

The kidney showed several histological anomalies such as basophilic tubules, tubular dilation, cellular atypias, proteinaceous casts, glomerulosclerosis, inflammation and fibrosis. All these findings were graded according to severity (Figure 11). Basophilic tubules, cytomegaly, and karyomegaly suggested regenerative changes (Figure 12B).

Tubular injuries were also identified through wrinkled and thickened basement membranes, demonstrated by PAS stain. Dilation of Bowman spaces and some cortical tubules occurred secondarily to tubular loss or tubular obstruction due to proteinaceous casts. All these findings characterize tubular injury and their frequency and severity increased in an activity-dependent manner, though no significant differences between control and treated mice could be shown. Glomerular injury was characterized by capsular and mesangial sclerosis and gave rise to

proteinaceous casts, visible by PAS staining (Figure 12D). Glomerular injuries were also identified through wrinkled and thickened basement membranes demonstrated by PAS staining. Some moderate interstitial lesions were recorded such as moderate inflammatory cell infiltration, and fibrosis (Masson's trichrome, Figure 12F). Similar to tubular injury, glomerular injury seemed to be activity-dependant although no statistically significant difference between groups could be shown. This is probably due to the limited sample size and on the setting of histological analysis, which was performed on mice dedicated to histopathological analysis at specific follow-up times irrespective of biochemical evidence of kidney failure that occurred late in the follow-up period.

#### Histological examination of lung, heart and spleen

Lung, heart and spleen did not show any histological alteration. Classical radiation-induced injury like pulmonary radiation fibrosis, vascular changes in heart, lymphoid depletion in the white pulp of the spleen, or diffuse fibrosis of the red pulp were not observed.

#### Relationship between histological and biochemical analysis

Even though statistical differences were not always found, histological observations (hepatocyte injury, necrosis, and fibrosis) correlated with the biochemical data of hepatocyte cytolysis (activity-dependent increase of AST and ALT), and suggest hepatocyte and interstitial injury at the high activities. Similarly, despite not reaching statistical significance in some cases, there was a link between histological modifications observed in the kidney (dilatation of Bowman spaces, glomerulosclerosis, intratubular proteinaceous casts) and the increase in biochemical renal biomarkers in the blood (activity-dependent increase of creatinine and BUN levels), clearly suggesting impaired renal function at the high activities due to tubular and glomerular injury.

### **Discussion**

This long-term toxicity study of  $^{213}\text{Bi}$  has been performed using radiolabeled BSA in order to evaluate tissue irradiation from the blood stream in a  $^{213}\text{Bi}$  RIT assay. The comparison of biodistribution and dosimetry of BSA and of two non-specific antibodies confirms that macromolecules like albumin or immunoglobulin have comparable behavior *in vivo* after intravenous injection. Early after injection, the volume of distribution of BSA is close to the blood volume of the organs. At 15 minutes after injection, the organ blood volume,

determined from our pharmacokinetic data, are in accordance with previous studies [20]. The volume of distribution of radiolabeled BSA or non-specific antibodies in organs with sinusoid or fenestrated capillaries are probably overestimated since macromolecules are distributed by convection in the perivascular interstitial volume at equivalent concentrations to that of plasma. This was observed in liver, spleen, kidney, and in bone where organ-to-blood dose ratios remained stable up to 24 hours after injection indicating a rapid equilibrium of the macromolecule concentration between interstitial and vascular space. Conversely, in intestine, muscles, skin and stomach the organ-to-blood dose ratio slowly increased with time. This would be in accordance with an accumulation of radiolabeled macromolecules in the interstitial space with an influx from the blood stream higher than the efflux by lymphatic drainage. However this accumulation remains moderate and takes place after the first period of  $^{213}\text{Bi}$  decay and so, only marginally modifies the mean dose to the organ.

Radiosensitivity estimates as a risk of late toxicity to the different organs have been well defined for RX irradiation of total organ volume ranking them, from the most to the less radiosensitive organ, as bone marrow, lung, kidney, heart and liver [21]. Our study of body irradiation from the blood contents with  $^{213}\text{Bi}$  gives a different scheme of long-term toxicity with liver more radiosensitive than kidney. No toxicity to the lung or heart can be observed by biochemical parameters and/or histological analysis, and toxicity to the bone marrow regardless of the injected dose remained transient and not limiting at injected activities used in this study.

The discrepancy between photon and alpha particle toxicities underlines the difficulties for alpha particles, to link a mean organ dose to toxicity and to define a relative biological effectiveness (RBE) with reference to external beam irradiation [22]. In total liver volume irradiation by external X-ray beam, liver damage occurs at doses above 30 Gy [23, 24]. A dose of 3.33 Gy (corresponding to 11.1 MBq  $^{213}\text{Bi}$ -BSA injected activity) to the liver in our long-term toxicity assay was sufficient to irreversibly impair liver function. We did not observe central vascular injury with central congestion and venous fibrosis, referred to as veno-occlusive disease (VOD) characteristic of X-ray late toxicity to the liver. However, sparse centrilobular fibrosis and periportal inflammation observed at the highest injected activity are consistent with a limited interstitial injury. Cellular atypias and progressive increases in plasma enzymes ALT and AST, at the highest  $^{213}\text{Bi}$ -BSA doses clearly demonstrate radiation induced toxicity to the liver.

The mean absorbed dose to the organ is insufficient to take into account the specificity of high-LET particle irradiation. While the energy deposit is homogenous for a given organ mass

for low-LET radiation like X or gamma rays, the actual energy deposition to an organ for a given mean absorbed dose of high-LET radiation are much more influenced by the localization of dose deposition at the cellular scale. As an example, hepatocytes are both irradiated from the blood within the capillaries that border them and by those located at distance less than 70  $\mu\text{m}$  (the length of an alpha track). Approximately, one disintegration occurs in a 10 micrometer capillary section per injected MBq. Given the 30  $\mu\text{m}$  size of hepatocytes and the 10  $\mu\text{m}$  diameter of a neighboring capillary, each alpha particle emitted in the blood flow encounters a hepatocyte, and each hepatocyte receives alpha particles from proximal capillaries and from capillaries located at distance. However, in larger blood vessels, alpha emission at a distance from vessel wall higher than 70  $\mu\text{m}$  have no effect on endothelial cells and surrounding tissues, but are taken into account for the mean absorbed dose to the organ.

Conversely, as far as lung is concerned, the tridimensional repartition of cells and their effective probability to be crossed by alpha tracks, may explain the lower radiosensitivity to alpha particles for at least three trivial reasons. Firstly, because of its alveolar structure the density of lung is one quarter that of liver so that the dose to organ takes into account the energy of the alpha particles lost in the air volume contrary to others organs where virtually the totality of the energy deposits in cells. Secondly, the distance between cells and the blood capillary and the density of the vascular network per volume of tissue is lower in lung compared to liver. Thirdly, the energy deposit within a cell is conditioned by its shape. As an example, the energy deposit by an alpha track crossing a type I pneumocyte is limited because of their flat shape with a cytoplasm covering the alveolar surface as a sheet of around 0.4  $\mu\text{m}$  in thickness. It is out of the scope of this article to provide a microdosimetric modeling of an alpha irradiation of the lung from the blood volume, but the unexpected radioresistance of lung to alpha particles compared to its high radiosensitivity to external beam irradiation underlines the inefficiency of the dose to organ for alpha irradiation dosimetry and the necessity to investigate dose deposit at the cellular level to link organ damage to injected activity.

This remains true when considering hematologic toxicity that was transient and non-limiting in our assay, regardless of the injected activity of  $^{213}\text{Bi}$ -BSA. The discrepancy with beta RIT, where dose to the bone marrow is limiting, requires taking into account the histological structure of the bone marrow in order to explain the limited toxicity of alpha particles. Watchman *et al.* studying the distance between bone marrow hematopoietic stem cells and the nearest capillary clearly shows that a large number of them are located further than 70  $\mu\text{m}$

from a blood vessel [25]. Even if some  $^{213}\text{Bi}$ -BSA leaves the blood flow and moves by convection into the interstitial space, it is likely that a sufficient number of stem cells located at distance from a blood vessel is protected from alpha irradiation, and is able to repopulate the bone marrow. Indeed, stem cell grafts following total body irradiation require as little as 5% of the pool of stem cells to successfully reconstitute hematopoiesis [26]. The kinetic of WBC, RBC and platelets reconstitutions after irradiation is very fast and corresponds to the time required for each hematopoietic population to differentiate and to be exported from bone marrow to the periphery. The nadir of platelets and leucocytes appeared to be independent of the injected activity, but at 11.1 MBq the recovery of a normal platelet count was delayed (24 days *versus* 14 days for 3.7 and 7.4 MBq injected activities). This would reflect a partial destruction of the bone marrow stroma that would impair central hematopoiesis and correlated with the appearance of EMH in the liver at injected activities higher than 3.7 MBq. The transient and reversible hematologic toxicity in response to  $^{213}\text{Bi}$  irradiation is in stark contrast with the delayed and irreversible toxicity observed in the liver.

In this study we did not detect any signs of acute liver toxicity. However Nakamae *et al.* [12] studying toxicity of a  $^{213}\text{Bi}$ -anti-CD45 monoclonal antibody detected a huge peak of AST and ALT as soon as three hours after antibody injection at a dose of 2.57 Gy to the liver attesting for an acute phase of cytolysis. AST and ALT then returned to baseline levels one week after RIT and during the eight week of their follow-up period. We did not observe this acute toxicity because in our follow-up setting the first measurement of AST and ALT takes place two weeks after injection. At this stage, AST and ALT were at the control level regardless of the injected activity as in the Nakamae study. AST and ALT in the plasma remains at the control level until week 11 and 7 respectively, when a significant increase is observed in mice injected with 11.1 MBq of  $^{213}\text{Bi}$ -BSA. This would imply that the irradiated hepatocytes would maintain a metabolic activity in accordance with the AST and ALT baseline level and body weight gain during a latency phase despite irreversible DNA damage that preclude further cell division when the cells are ageing.

There is still debate about the kind of cell death induced by low- and high-LET radiations. Transcriptome analysis of cancer cells responding to ionizing radiation indicate that p21 is overexpressed after  $^{213}\text{Bi}$  irradiation in accordance with a cell cycle arrest in G2/S phase, and with necrosis and mitotic cell death rather than apoptosis. Waldman *et al.* comparing responses to ionizing radiation on p21+ and p21- cells noted that their radiosensitivity, estimated by a clonogenic test, was equivalent. However p21+ cells that are unable to form colonies remain alive in a resting state contrary to p21- cells that disappear due to apoptotic

cell death [27]. Taken together, this finding would be relevant with the late occurrence of this toxicity that would be related to an impairment of liver regeneration due to mitotic cell death of irradiated hepatocytes appearing at the time of their renewal.

Additional features of hepatocytes support such an assertion. Firstly, the naturally high level of polyploidy and multinucleation of hepatocytes encountered in adult mouse liver would enable enhanced survival of irradiated resting cells increasing the likelihood to keep at least one intact gene after irradiation because of multiple copy of each genes [28]. Secondly, cell division is not the only mechanism of liver regeneration. Indeed in liver reconstitution experiments the mechanisms of liver regeneration are distinct and depend on extent of hepatectomy. Liver regeneration following 30% hepatectomy requires long lasting cell hypertrophy, whereas after 75% hepatectomy the hypertrophic phase is followed by a definitive proliferation phase [29]. Whilst regeneration after hepatectomy probably does not fully reflect regeneration following systemic destruction of liver parenchymal cells by irradiation, it is possible that after an acute phase of cell death hepatocytes irradiated below a threshold maintain a hypertrophic 'phenotype'. This may in turn compensate for cell loss, and the ability to undergo incomplete mitosis gives rise to an increased polyploidy as has been described after X-ray irradiation[30]. This would be consistent with the significantly increased cytomegaly and caryomegaly related to polyploidy observed in liver for injected activities over 3.7 MBq. To our knowledge, comparison of liver responses to X and alpha irradiation has not been specifically addressed and transcriptome data of cancer cell-lines after alpha irradiation are not sufficient to explain the discrepancy on the doses leading to liver radio-induced defects following X or alpha irradiation. One peculiarity of this study is the systemic irradiation with  $^{213}\text{Bi}$ -BSA that exerts its effect simultaneously on all organs. This may in part explain why mice died before strong evidence of VOD in our histopathological examination. It is likely that kidney toxicity appears earlier at high-injected activities than in the 7.4 MBq consistent with the increase of creatinine and uremia in the 11.1 MBq group. Multiple organ failure at high-injected activity may precipitate animal death even if toxicity to the liver is limiting in our long-term toxicity study.

Our results are consistent with those observed for alpha RIT in conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation in dogs treated with  $^{213}\text{Bi}$ -anti-CD45 [31] or  $^{213}\text{Bi}$ -anti- $\alpha\beta\text{TCR}$  chain antibody [32] and in human for anti-leukemic treatment with  $^{213}\text{Bi}$ -anti CD33 [33, 34, 35]. In dog, a transient increase of ALT and AST consistent with liver toxicity was observed for injected doses of  $^{213}\text{Bi}$  anti-TCR $\alpha\beta$  over 130 MBq/kg. One dog treated with 326 MBq/kg of  $^{213}\text{Bi}$ -anti-TCR $\alpha\beta$  was euthanized because of liver failure. Dogs treated with  $^{213}\text{Bi}$ -

anti-CD45 exhibit more pronounced liver toxicity at injected activities above 120 MBq/kg probably because of a higher liver uptake of anti-CD45 than anti-TCR $\alpha\beta$ . Interestingly, like in mice, this increase in liver enzyme appear between day 40 and 100. Histologic examination of the liver of dogs receiving the highest doses of anti-CD45 or anti-TCR $\alpha\beta$  reveal slight signs of sinusoidal fibrosis and minimal bile duct abnormalities, and similar to mice, are not consistent with radiation induced VOD and liver fibrosis following high doses of X-rays. In humans receiving  $^{213}\text{Bi}$ -anti-CD33 for RIT for myeloid leukemia, although injected activities are ten times lower than in dog (ranging from 10.36 to 37 MBq/kg) the only adverse effect reported, except the hematologic toxicity, was a transient liver function abnormality on one third of the patients between day 5 and 14 (Jurcic J.G 2002). In another clinical trial combining Cytarabine and RIT with  $^{213}\text{Bi}$  anti-CD33 treatments, a mild liver toxicity (<grade3) appeared at low injected activities and grade 3 and 4 toxicity for injected activities upper to 37 MBq/kg injected activity required for clinical responses to be observed. This would be consistent with an early increase of AST and ALT in the mouse soon after injection of  $^{213}\text{Bi}$ -anti-CD45 reported by Nakamae *et al.* at the dose of 2.57 Gy to the liver (corresponding to an injected activity of 50  $\mu\text{Ci}$ ). Given the scale differences between the different species and the specificity of the  $^{213}\text{Bi}$ -monoclonal antibody used in these assays, it is interesting to compare the doses to liver between the species.

In our long-term toxicity study in mice, liver toxicity is observed in the group of mice receiving 11.1 MBq (343 MBq/kg) corresponding to 3.33 Gy to liver whereas only some mice injected with 7.4 MBq (2.22 Gy) experienced a transient increase in transaminase. In dogs treated with a  $^{213}\text{Bi}$ -anti-CD45, an increase of transaminase and alkaline phosphatase occurs between day 40 and day 100. The plasma level of enzymes returned to baseline for two dogs receiving 1.64 and 1.32 Gy to the liver whereas a third dog receiving 1.83 Gy to the liver had an increase of transaminase and alkaline phosphatase after day 120 and developed ascite and liver failure. The use of  $^{213}\text{Bi}$ -anti-TCR $\alpha\beta$  for T-cell ablation in dogs results in transient increases in transaminase without evidence of liver failure for 1.8 Gy to the liver whereas a dose of 3.52 Gy induced a sustained elevation of transaminase and histological liver failure [32].

In human clinical trials, doses are calculated from images and are given in Sv in place of Gy because a multiplication factor of 5, corresponding to the RBE of alpha particle is included in the dose calculation. In an article dealing more specifically with pharmacokinetics and dosimetry [35] a mean dose to the liver can be estimated to be  $5.21 \pm 1.58$  mSv/MBq that roughly corresponds to a mean dose of 1.1 mGy/MBq when a RBE of 5 is not taken into

account like in our dose calculation in mice. A patient of 65.9 Kg (mean patient weight in this study) would thus have received 2.68 Gy to the liver for an injected activity of 37 MBq/kg that corresponds to the threshold where liver damage appears with  $^{213}\text{Bi}$ -anti-CD33 used in the course of RIT clinical trial for leukemia. Of course, these dose estimations to the liver are to be taken into account with caution given the different methods of measurement, the approximation we made for human dose calculation and the multi-step injection in dog and human versus single injection in mouse. Nevertheless, the doses to liver between these different species are quite homogenous and would indicate that beyond 2-2.5 Gy the risk of irreparable liver failure needs to be taken into consideration for alpha RIT whatever the vector used for RIT. It is noteworthy that in dog, the same experiment settings for the conditioning to allogeneic hematopoietic cell transplantation, with an anti-CD45 antibody radiolabeled with astatine-211 instead of  $^{213}\text{Bi}$  have been carried out. Dogs treated with activities above 17 MBq/kg develop ascite and have increased transaminase and alkaline phosphatase around day 100 after injection. No parenchymal liver injury could be detected by histological observation, similar to liver toxicity with  $^{213}\text{Bi}$ -anti-CD45. This underlines the comparable biologic activity of high-LET alpha particles distinct from the low-LET X-rays or beta particles. Toxicity to other organs in dogs and human were mild and similar to our mouse model. In mouse, a late toxicity to the kidney is observed for injected activity of 7.4 MBq (2.66 Gy to the kidney). It is necessary to take into account this kidney toxicity in comparison to a potential therapeutic benefit in RIT treatment and according to the toxicity of gold standard treatment for the same pathology.

## **Conclusion**

This long-term toxicity study with  $^{213}\text{Bi}$ -BSA points out the peculiar sensitivity of the liver to alpha particles. This was unexpected since most of the alpha RIT studies performed in mouse have ended before liver toxicity arises, in such a way that hematologic toxicity appeared as the dominant side-effect. Compared to irradiations of low-LET particle like X rays the ranking of organ radiosensitivity is totally different: the lung is the most radiosensitive organ to X rays and liver damage appears beyond 30 Gy, whereas alpha RIT in mouse with radiolabeled proteins doses beyond 3 Gy entail irreversible damages to liver, whereas the lung remains unaffected, at least from a histological point of view

Concerning hematologic toxicity, an early and deep decrease in blood cell count is observed with alpha RIT. Despite this, the recovery of normal blood cell counts is rapidly reached

suggesting the survival of sufficient numbers of hematopoietic stem cells to reconstitute the pool of blood cells. This study emphasizes that microdosimetry at the cell level is mandatory to explain the differences between low and high-LET particles toxicity to healthy organs and that RBE of alpha particles are distinct depending on the considered organs.

### **Author's contributions**

LD and JA participated in the study design, interpretation of histological data and drafted the manuscript. EBC participated in the study design, interpretation of biochemical data and drafted the manuscript. FD participated in the study design, data interpretation and drafted the manuscript. SG and CM performed RIT assay. FB and AM have provided  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$  generator. MC supervised the study provided administrative or material support and participated in the critical review.

All authors read and approved the final manuscript.

## References

1. Pagel JM, Kenoyer AL, Bäck T, Hamlin DK, Wilbur DS, Fisher DR, Park SI, Frayo S, Axtman A, Orgun N, Orozco J, Shenoi J, Lin Y, Gopal AK, Green DJ, Appelbaum FR, Press OW: **Anti-CD45 pretargeted radioimmunotherapy using bismuth-213: high rates of complete remission and long-term survival in a mouse myeloid leukemia xenograft model.** *Blood* 2011, **118**(3):703–711.
2. Kennel SJ, Boll R, Stabin M, Schuller HM, Mirzadeh S: **Radioimmunotherapy of micrometastases in lung with vascular targeted  $^{213}\text{Bi}$ .** *Br J Cancer* 1999, **80**(1/2):175–184.
3. Song EY, Rizvi SMA, Qu CF, Raja C, Brechbiel MW, Morgenstern A, Apostolidis C, Allen BJ: **Pharmacokinetics and toxicity of  $^{213}\text{Bi}$ -labeled PAI2 in preclinical targeted alpha therapy for Cancer.** *Cancer Biol Ther* 2007, **6**(6):898–904.
4. Pouget J, Mather SJ: **General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2001, **28**(4):541–561.
5. Bäck T, Haraldsson B, Hultborn R, Jensen H, Johansson ME, Lindegren S, Jacobsson L: **Glomerular filtration rate after alpha-radioimmunotherapy with  $^{211}\text{At}$ -MX35-F(ab') $_2$ : a long-term study of renal function in nude mice.** *Cancer Biother Radiopharm* 2009, **24**(6):649-658.
6. Jaggi JS, Seshan SV, McDevitt MR, LaPerle K, Sgouros G, Scheinberg DA: **Renal tubulointerstitial changes after internal irradiation with alpha-particle-emitting actinium daughters.** *J Am Soc Nephrol* 2005, **16**(9):2677–2689.
7. Schwartz J, Jaggi JS, O'Donoghue JA, Ruan S, McDevitt M, Larson SM, Scheinberg DA, Humm JL: **Renal uptake of bismuth-213 and its contribution to kidney radiation dose following administration of actinium-225-labeled antibody.** *Phys Med Biol* 2011, **56**(3):721-733.
8. Behr TM, Sgouros G, Stabin MG: **Studies on the red marrow dosimetry in radioimmunotherapy: an experimental investigation of factors influencing the radiation-induced myelotoxicity in therapy with  $\beta$ - , Auger/conversion electron- , or  $\alpha$  - emitters.** *Clin. Cancer Res* 1999, **5**:3031s–3043s.
9. Park SI, Shenoi J, Pagel JM, Hamlin DK, Wilbur DS, Orgun N, Kenoyer AL, Frayo S, Axtman A, Bäck T, Lin Y, Fisher DR, Gopal AK, Green DJ, Press OW: **Conventional and pretargeted radioimmunotherapy using bismuth-213 to target and treat non-Hodgkin lymphomas expressing CD20: a preclinical model toward optimal consolidation therapy to eradicate minimal residual disease.** *Blood* 2010, **116**(20):4231–4239.

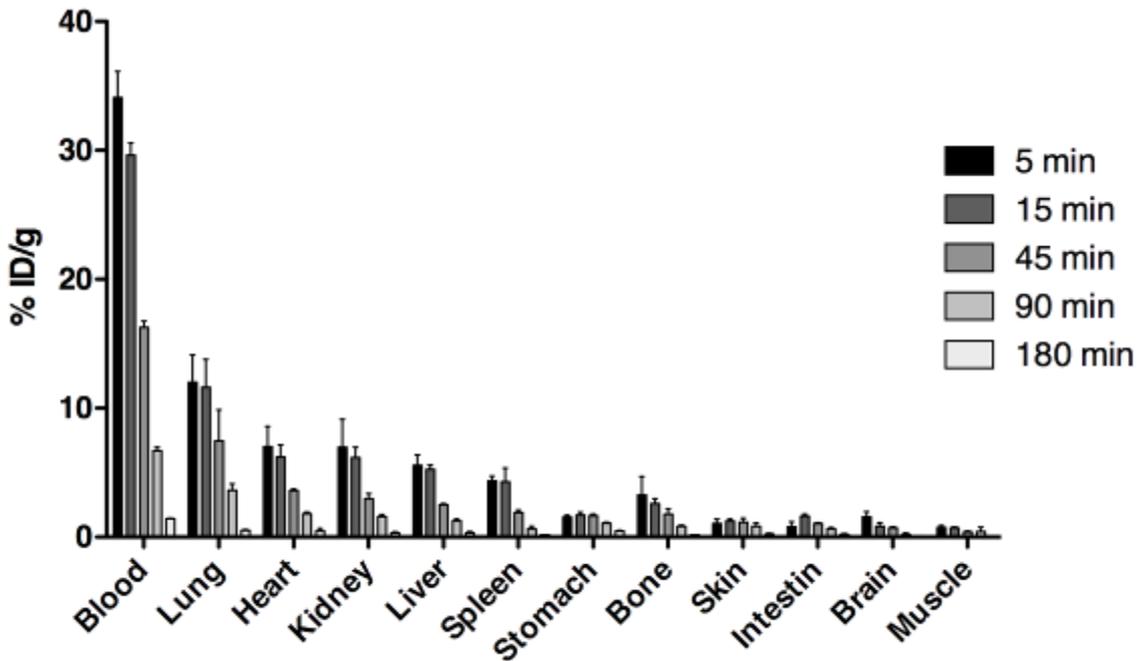
10. Wild D, Frischknecht M, Zhang H, Morgenstern A, Bruchertseifer F, Boisclair J, Provencher-Bolliger A, Reubi JC, Maecke HR: **Alpha- versus beta-particle radiopeptide therapy in a human prostate cancer model ( $^{213}\text{Bi}$ -DOTA-PESIN and  $^{213}\text{Bi}$ -AMBA versus  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-PESIN).** *Cancer Res* 2011, **71**(3):1009–18.
11. Yao Z, Zhang M, Garmestani K, Axworthy, Donald B, Mallett RW, Fritzberg AR, Theodore LJ, Plascjak PS, Eckelman WC, Waldmann TA, Pastan I, Paik CH, Brechbiel MW, Carrasquillo JA: **Pretargeted alpha emitting radioimmunotherapy using  $^{213}\text{Bi}$  1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid-biotin.** *Clin. Cancer Res* 2004, **10**:3137–3146.
12. Nakamae H, Wilbur DS, Hamlin DK, Thakar MS, Santos EB, Fisher DR, Kenoyer AL, Pagel JM, Press OW, Storb R, Sandmaier BM: **Biodistributions, myelosuppression, and toxicities in mice treated with an anti-CD45 antibody labeled with the alpha-emitting radionuclides bismuth-213 or astatine-211.** *Cancer Res* 2009, **69**(6):2408–2415.
13. Axelsson I, Heinegård D: **Characterization of the keratan sulphate proteoglycans from bovine corneal stroma.** *Biochem J* 1978, **169**(3):517–30.
14. Nikula TK, Curcio MJ, Brechbiel MW, Gansow OA, Finn RD, Scheinberg DA: **A rapid, single vessel method for preparation of clinical grade ligand conjugated monoclonal antibodies.** *Nucl Med Biol* 1995, **22**(3):387–390.
15. Apostolidis C, Molinet R, Rasmussen G, Morgenstern A: **Production of Ac-225 from Th-229 for targeted alpha therapy.** *Anal Chem* 2005, **77**(19):6288–6291.
16. Chérel M, Gouard S, Gaschet J, Saï-Maurel C, Bruchertseifer F, Morgenstern A, Bourgeois M, Gestin JF, Kraeber-Bodéré F, Barbet J, Moreau P, Davodeau F:  **$^{213}\text{Bi}$  radioimmunotherapy with an anti-mCD138 monoclonal antibody in a murine model of multiple myeloma.** *J Nucl Med.* 2013, **54**(9):1597–604.
17. Kraeber-Bodéré F, Rousseau C, Bodet-Milin C, Ferrer L, Faivre-Chauvet A, Campion L, Vuillez JP, Devilliers A, Chang CH, Goldenberg DM, Chatal JF, Barbet J: **Targeting, toxicity, and efficacy of 2-step pretargeted radioimmunotherapy using a chimeric bispecific antibody and  $^{131}\text{I}$ -labeled bivalent hapten in a phase I optimization clinical trial.** *J Nucl Med* 2006,**47**:247–55.
18. Fraker PJ, Speck JC: **Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril.** *Biochem Biophys Res Commun* 1978, **80**(4):849–857.
19. Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, Nyska A, Rousseaux C, Nolte T, Malarkey DE, Kaufmann W, Küttler K, Deschl U, Nakae D, Gregson R, Vinlove MP, Brix AE, Singh B,

- Belpoggi F, Ward JM: **Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system.** *Toxicol Pathol* 2010, **38**(7 Suppl):5S–81S.
20. Boswell CA, Ferl GZ, Mundo EE, Schweiger MG, Marik J, Reich MP, Theil FP, Fielder PJ, Khawli LA: **Development and evaluation of a novel method for preclinical measurement of tissue vascular volume.** *Mol Pharm* 2010, **7**(5):1848–1857.
21. Milano MT, Constine LS, Okunieff P: **Normal tissue tolerance dose metrics for radiation therapy of major organs.** *Semin Radiat Oncol* 2007, **17**(2):131-140.
22. Dahle J, Jonasdottir TJ, Heyerdahl H, Nesland JM, Borrebaek J, Hjelmerud AK, Larsen RH: **Assessment of long-term radiotoxicity after treatment with the low-dose-rate alpha-particle-emitting radioimmunoconjugate (227)Th-rituximab.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010, **37**(1):93–102.
23. Fajardo LF, Colby TV: **Pathogenesis of veno-occlusive liver disease after radiation.** *Arch Pathol Lab Med* 1980, **104**(11):584-588.
24. Guha C, Sharma A, Gupta S, Landshammer A, Muth S, Yagita H, Schwendener R, Pruschy M, Knuth A, van den Broek M: **Amelioration of radiation-induced liver damage in partially hepatectomized rats by hepatocyte transplantation.** *Cancer Res* 1999, **59**:5871–5874.
25. Watchman CJ, Bourke VA, Lyon JR, Knowlton AE, Butler SL, Grier DD, Wingard JR, Braylan RC, Bolch WE: **Spatial distribution of blood vessels and CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells within the marrow cavities of human cancellous bone.** *J Nucl Med* 2007, **48**(4):645–654.
26. Fliedner TM, Graessle D, Paulsen C, Reimers K: **Structure and function of bone marrow hemopoiesis: mechanisms of response to ionizing radiation exposure.** *Cancer Biother Radiopharm* 2002, **17**(4):405–26.
27. Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, Yu J, Kinzler K, Vogelstein B, Williams J: **Cell-cycle arrest versus cell death in cancer therapy.** *Nat Med* 1997, **3**(9):1034–1036.
28. Gentric G, Desdouets C, Celton-Morizur S: **Hepatocytes polyploidization and cell cycle control in liver physiopathology.** *Int J Hepatol* 2012, **2012**:1–8.
29. Miyaoka Y, Ebato K, Kato H, Arakawa S, Shimizu S, Miyajima A: **Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration.** *Curr Biol* 2012, **22**(13):1166–1175.
30. Gorla GR, Malhi H, Gupta S: **Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells.** *J Cell Sci* 2001, **114**(16):2943–2951.

31. Sandmaier BM, Bethge WA, Wilbur DS, Hamlin DK, Santos EB, Brechbiel MW, Fisher DR, Storb R: **Bismuth 213–labeled anti-CD45 radioimmunoconjugate to condition dogs for nonmyeloablative allogeneic marrow grafts.** *Blood* 2002,100:318–326.
32. Bethge WA, Wilbur DS, Storb R, Hamlin DK, Santos EB, Brechbiel MW, Fisher DR, Sandmaier BM: **Selective T-cell ablation with bismuth-213-labeled anti-TCR alpha beta as nonmyeloablative conditioning for allogeneic canine marrow transplantation.** *Blood* 2003, **101**(12):5068–75.
33. Jurcic JG, Larson SM, Sgouros G, McDevitt MR, Finn RD, Divgi CR, Ballangrud AM, Hamacher KA, Ma D, Humm JL, Brechbiel MW, Molinet R, Scheinberg DA: **Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia.** *Blood* 2002, **100**(4):1233–9.
34. Rosenblat TL, McDevitt MR, Mulford DA, Pandit-Taskar N, Divgi CR, Panageas KS, Heaney ML, Chanel S, Morgenstern A, Sgouros G, Larson SM, Scheinberg D, Jurcic JG: **Sequential cytarabine and alpha-particle immunotherapy with bismuth-213-lintuzumab (HuM195) for acute myeloid leukemia.** *Clin Dev Immunol* 2010, **16**(21):5303–5311.
35. Sgouros G, Ballangrud AM, Jurcic JG, McDevitt MR, Humm JL, Erdi YE, Mehta BM, Finn RD, Larson SM, Scheinberg DA: **Pharmacokinetics and dosimetry of an alpha-particle emitter labeled antibody: 213Bi-HuM195 (anti-CD33) in patients with leukemia.** *J Nucl Med* 1999, **40**(11):1935–46.

**Figure 1:** Biodistribution study with  $^{125}\text{I}$ -BSA.

Three mice were sacrificed at each time points (5, 15, 45, 90 and 180 minutes). The results were given as the mean % injected dose/g.

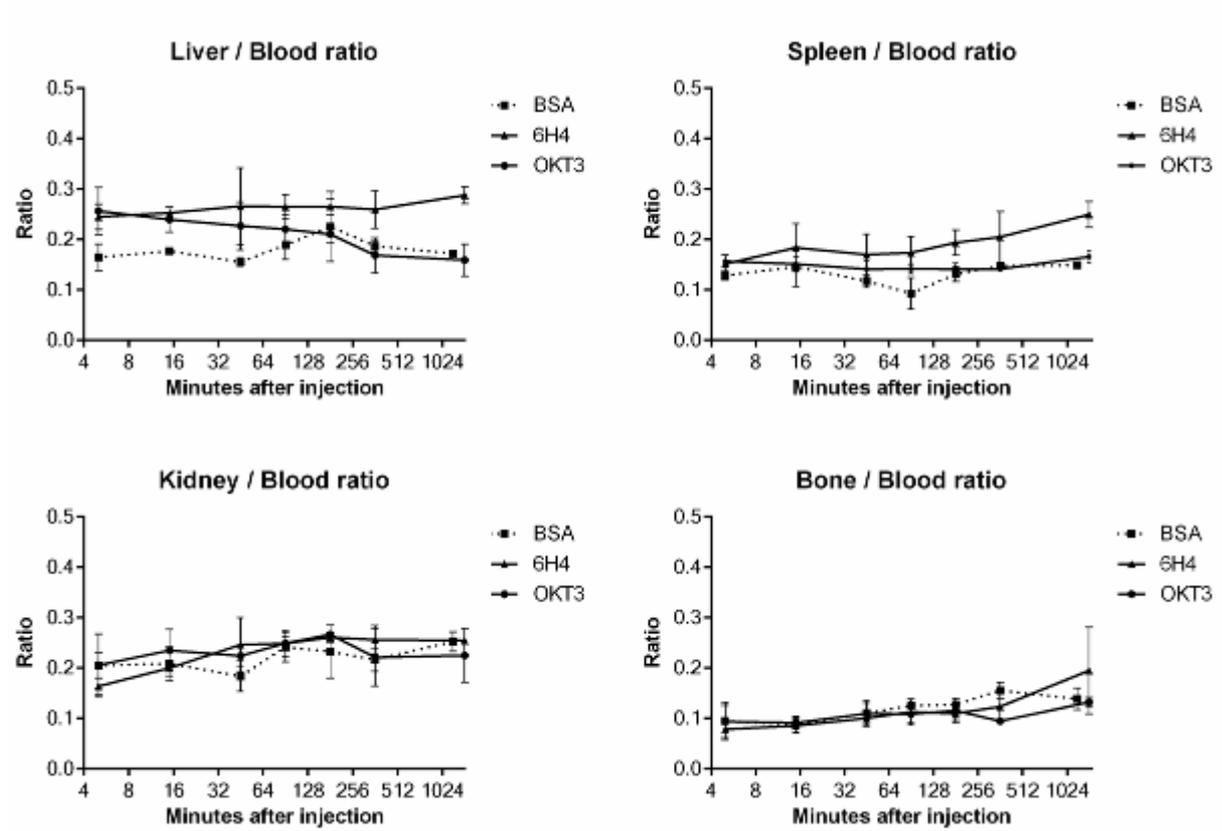


**Table 1:** Dose to organ calculations

Gy/MBq	BSA	OKT3	6H4
Blood	1.72	1.95	2.16
Lung	0.75	0.74	1.16
Heart	0.41	0.56	0.55
Kidney	0.36	0.46	0.49
Liver	0.30	0.46	0.56
Spleen	0.21	0.29	0.38
Stomach	0.21	0.12	0.10
Bone	0.18	0.21	0.21
Skin	0.14	0.10	0.10
Intestine	0.13	0.13	0.12
Brain	0.06	0.10	0.08
Muscle	0.06	0.04	0.05

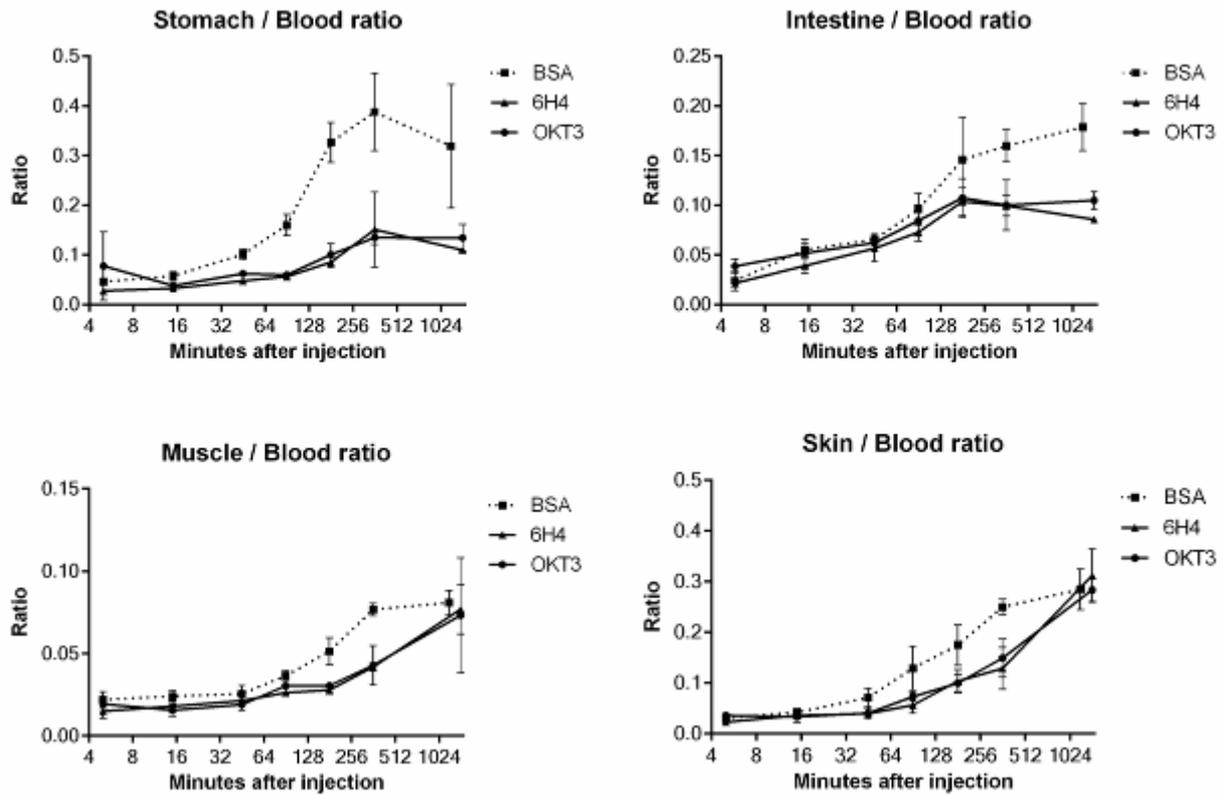
**Figure 2:** Organ-to-blood ratio of  $^{125}\text{I}$ -BSA,  $^{125}\text{I}$ -6H4 and  $^{125}\text{I}$ -OKT3 in the liver, spleen, kidney and bone ( $\pm$  SD).

The results are presented as the mean organ/blood dose ratio. Liver, spleen, kidney and bone display constant organ-to-blood dose ratio over the time of  $^{213}\text{Bi}$  decay. Equilibrium between blood and interstitial volume is reflected by as a constant ratio.



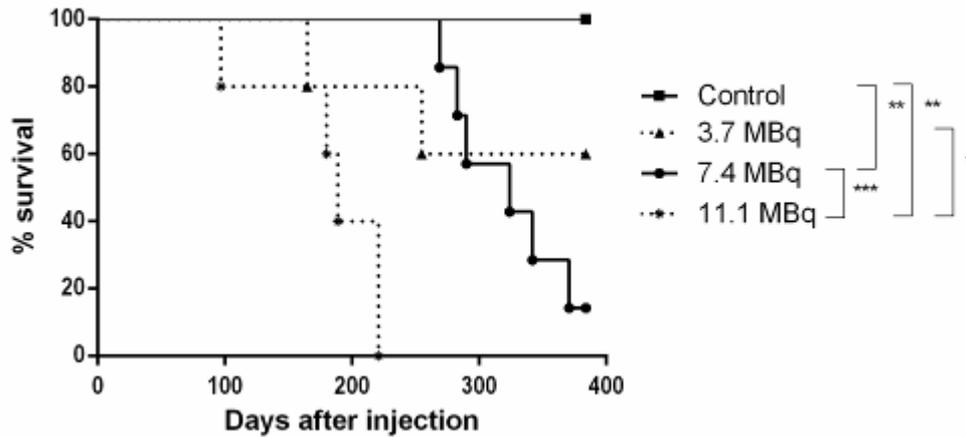
**Figure 3:** Organ-to-blood ratio of  $^{125}\text{I}$ -BSA,  $^{125}\text{I}$ -6H4 and  $^{125}\text{I}$ -OKT3 in the stomach, intestine, muscle and skin ( $\pm$  SD).

The results are presented as the mean organ/blood dose ratio. In the stomach, intestine, muscle and skin the organ-to-blood ratio progressively increases with time indicating that equilibrium between blood and interstitial compartment is not reached during the time of  $^{213}\text{Bi}$  decay. A rise of this ratio with time indicates an accumulation of the radiolabeled vector within the interstitial volume.



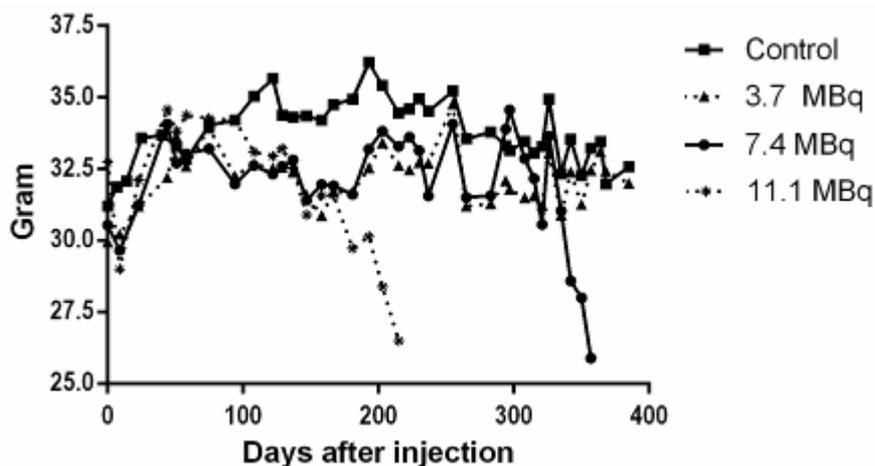
**Figure 4:** Survival of mice injected with increasing activities of  $^{213}\text{Bi}$ -BSA

Three groups of mice are injected with  $^{213}\text{Bi}$ -BSA at increasing activities: 3.7 MBq (n=5), 7.4 MBq (n=7), 11.1 MBq (n=5) and a control group (n=5) is injected with PBS. Survival is followed-up over a 385 days period. In the 11.1 MBq treated group, all mice die between D97 and D221 with a median survival of 189 days. Five mice among seven injected with 7.4 MBq die between D269 and D357 with a median survival of 324 days. In the 3.7 MBq treated group, one mouse die at D165 and second one at D255. The median survival is not reached in this group and 3 mice are still alive at the end of the follow-up period. All the mice in the control group survive up to the end of the assay.

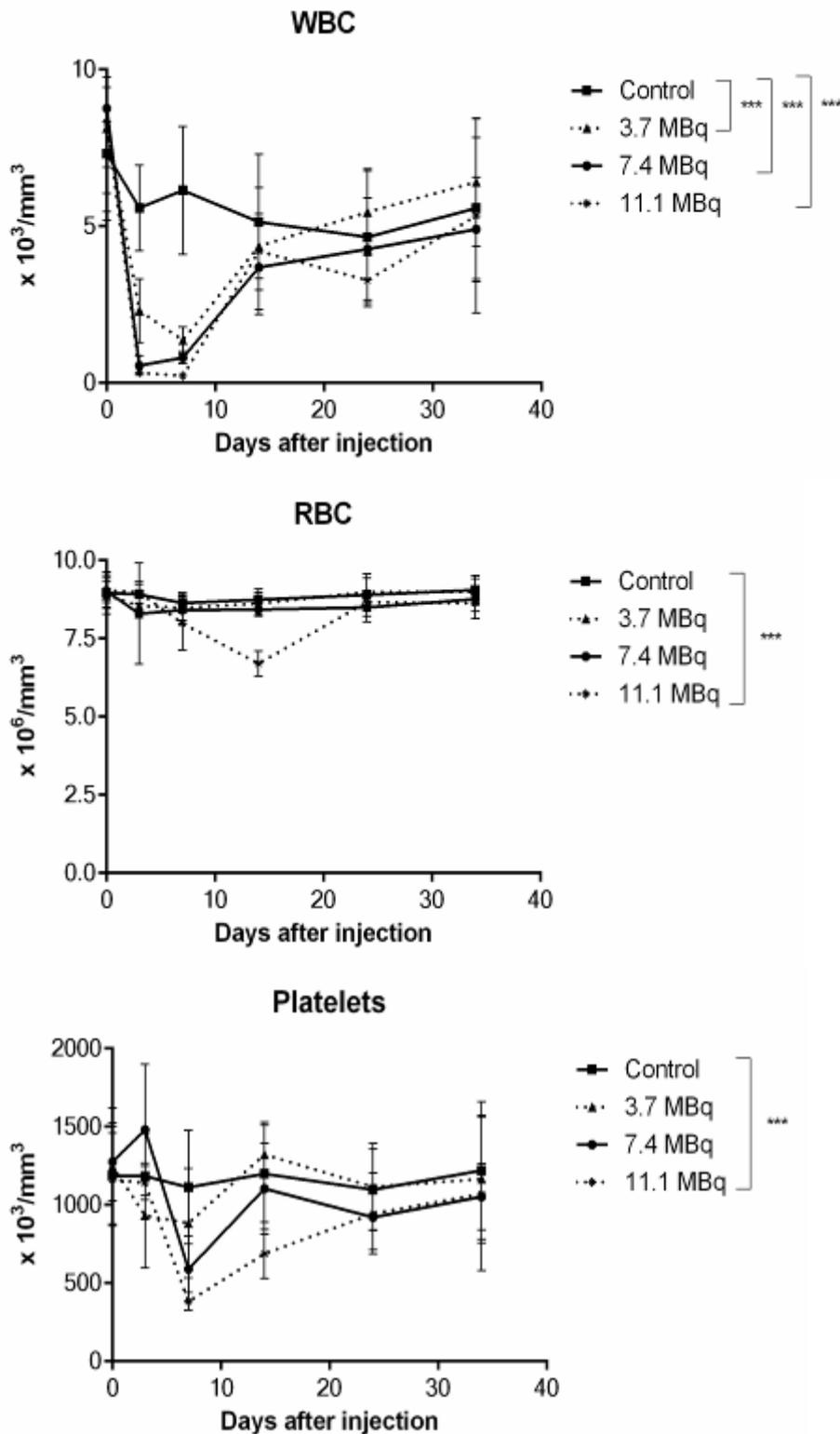


**Figure 5:** Total body weight of mice injected with increasing activities of  $^{213}\text{Bi}$ -BSA

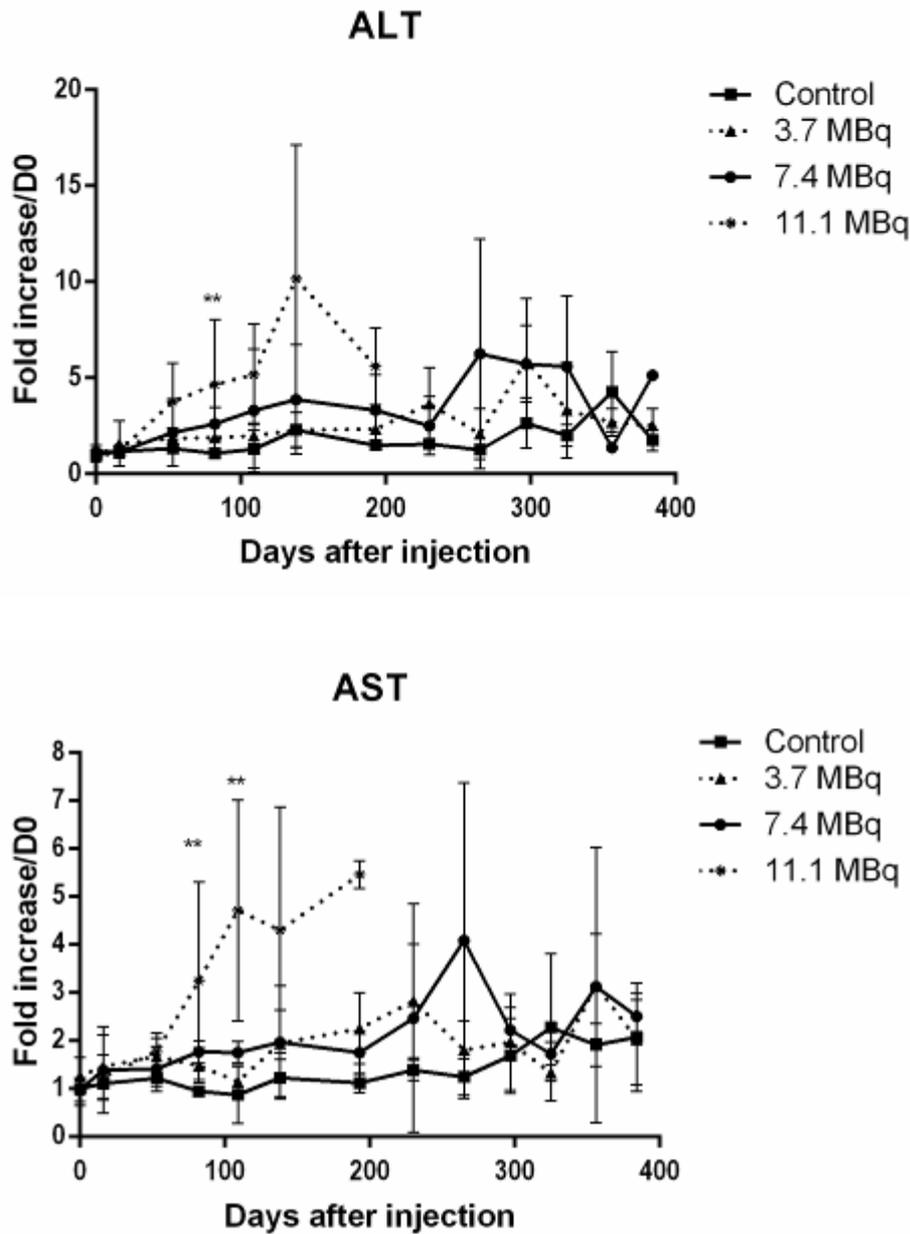
Three groups of mice are injected with  $^{213}\text{Bi}$ -BSA at increasing activities: 3.7 MBq (n=5), 7.4 MBq (n=7), 11.1 MBq (n=5) and a control group is injected with PBS (n=5). The total body weight is followed-up over a 385 days period. The first 10 days, all mice show a body weight loss, corresponding to the acute radiation toxicity. The body weight then increases until day 75. Then a drop in weight curves is observed for all treated groups compared to control up to day 150. Thereafter differences between treated groups begin to appear and the weight curves of the 11.1 MBq-treated mice rapidly decreases concomitantly with the death of mice in this group between day 97 and day 221.



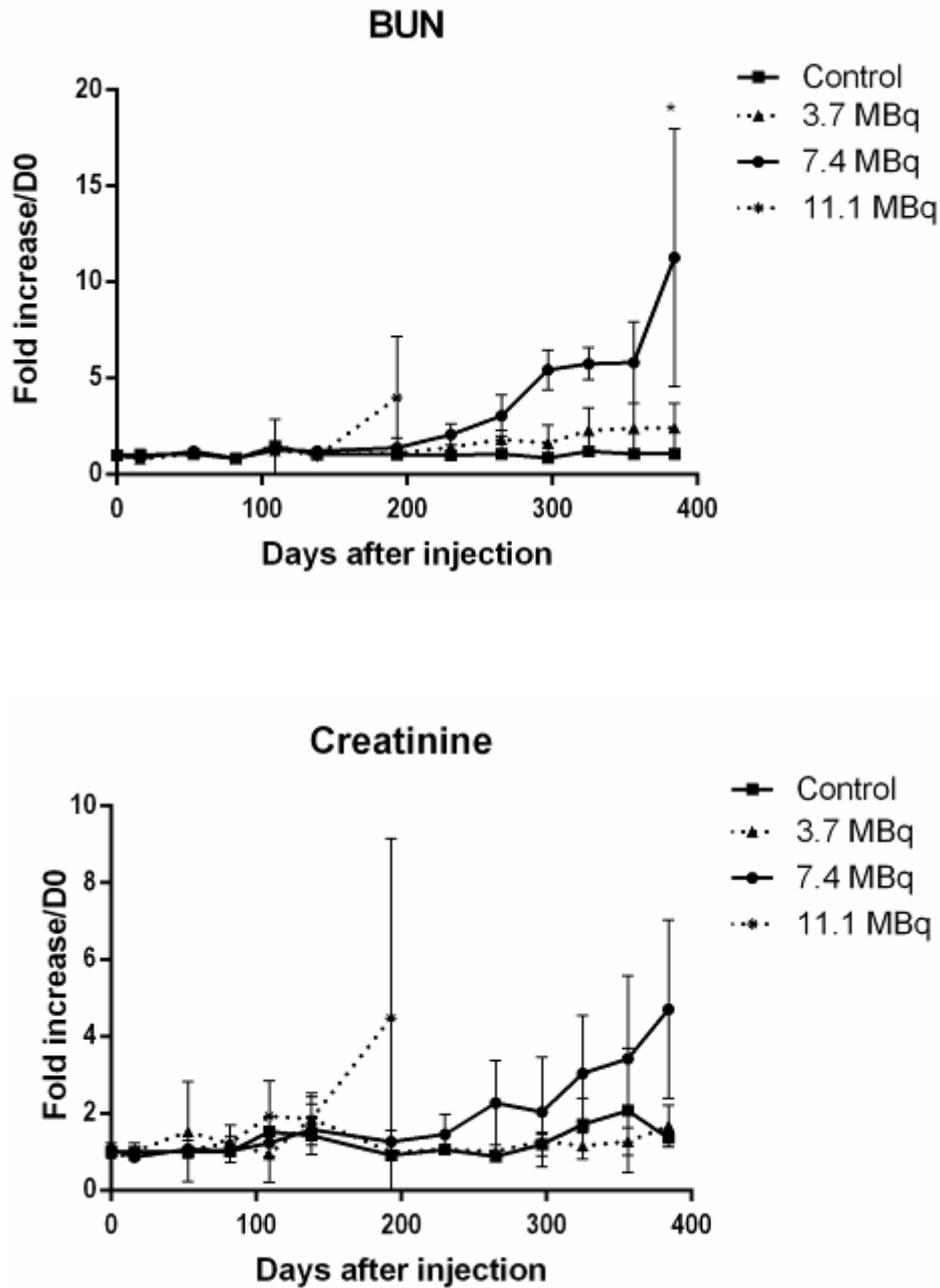
**Figure 6:** Hematologic toxicity is assessed by monitoring WBC, RBC, and platelets in peripheral blood collected weekly after injection. Early (3-6 days) activity-dependent marked leucopenia and thrombocytopenia are noticed. These effects are transient and physiological levels are reached at day 25.



**Figure 7:** Liver toxicity is assessed by monitoring ALT and AST in plasma from peripheral blood collected monthly after injection. Activity-dependent increase of ALT and AST indicates hepatocytes injury (degeneration, necrosis or cytolysis) at the high activities (> 3.7 MBq).

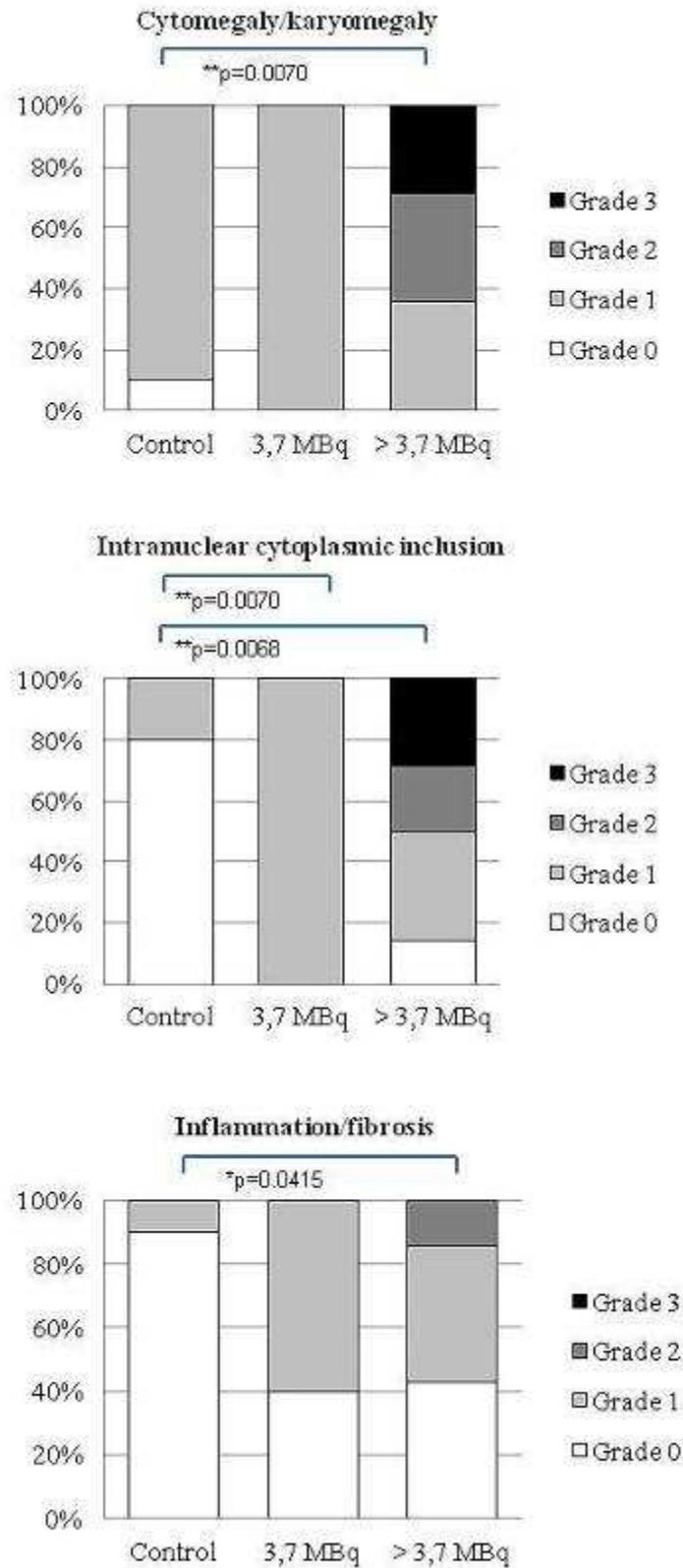


**Figure 8:** Kidney toxicity is assessed by monitoring creatinine and blood urea nitrogen in plasma from peripheral blood collected monthly after injection. Activity-dependent increase of creatinine and BUN denotes renal function impairment at the high activities (> 3.7 MBq).

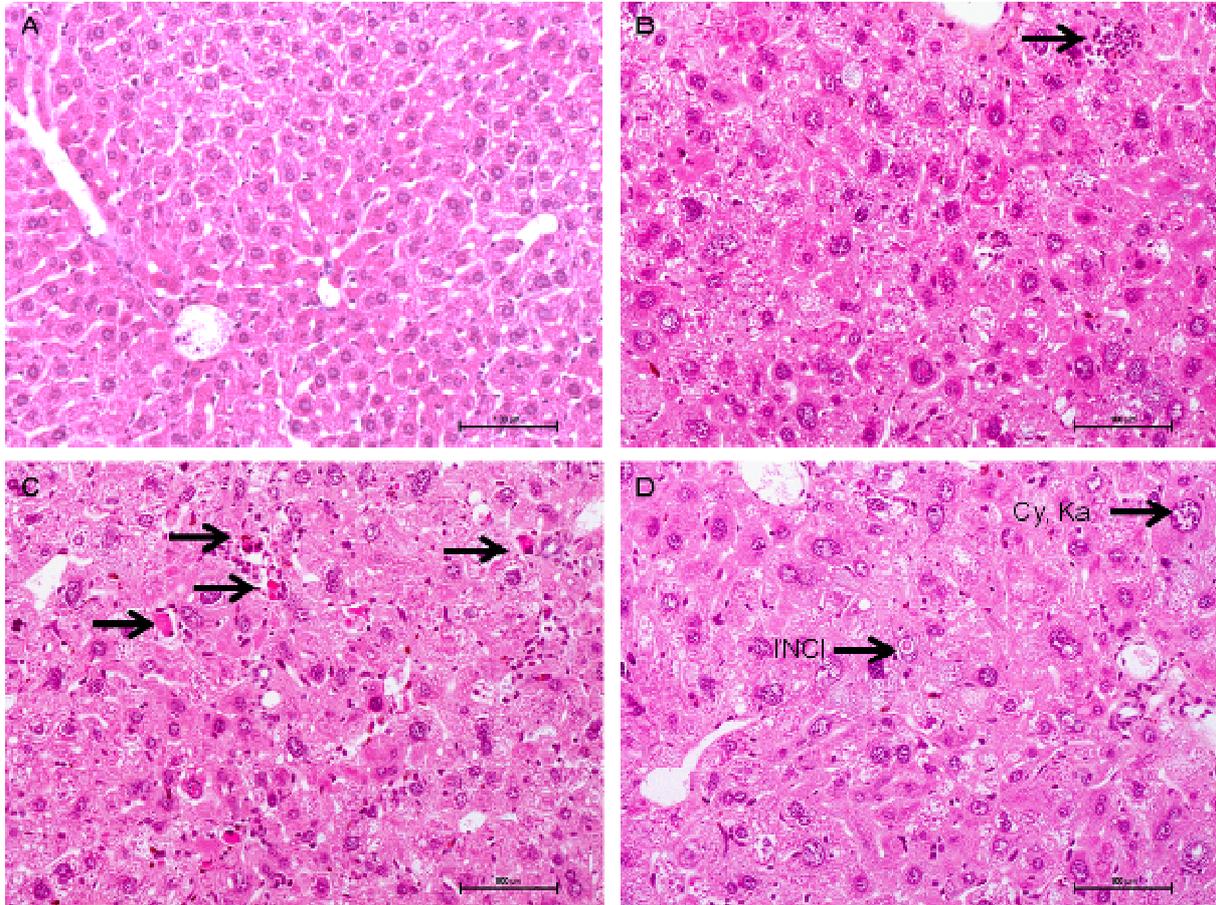


**Figure 9:** Grade of activity-related hepatic histological findings.

Activity-related increased karyomegaly, cytomegaly, intranuclear cytoplasmic invagination, inflammation and fibrosis are noticed.

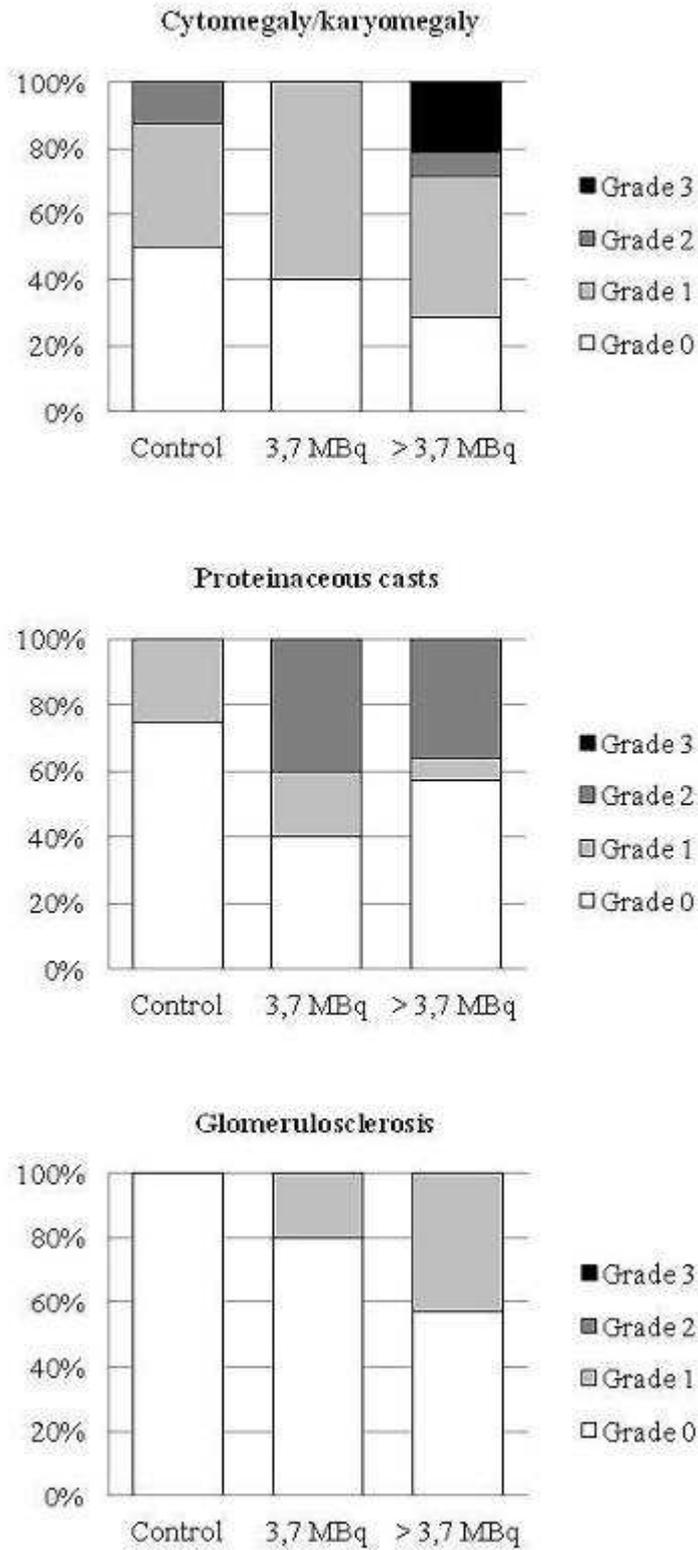


**Figure 10:** Comparison between liver of control animals and liver of animals injected with an activity of 11.1 MBq, 26 weeks after injection. Control liver (A) compared to injected liver showing extramedullary hematopoiesis (B, arrow), isolated necrosis (C, arrow), karyomegaly (Ka) and cytomegaly (Cy) and intranuclear acidophilic cytoplasmic invagination (INCI) (D), Hemalun-Eosin-Saffron, x400 (bar = 100  $\mu\text{m}$ ).



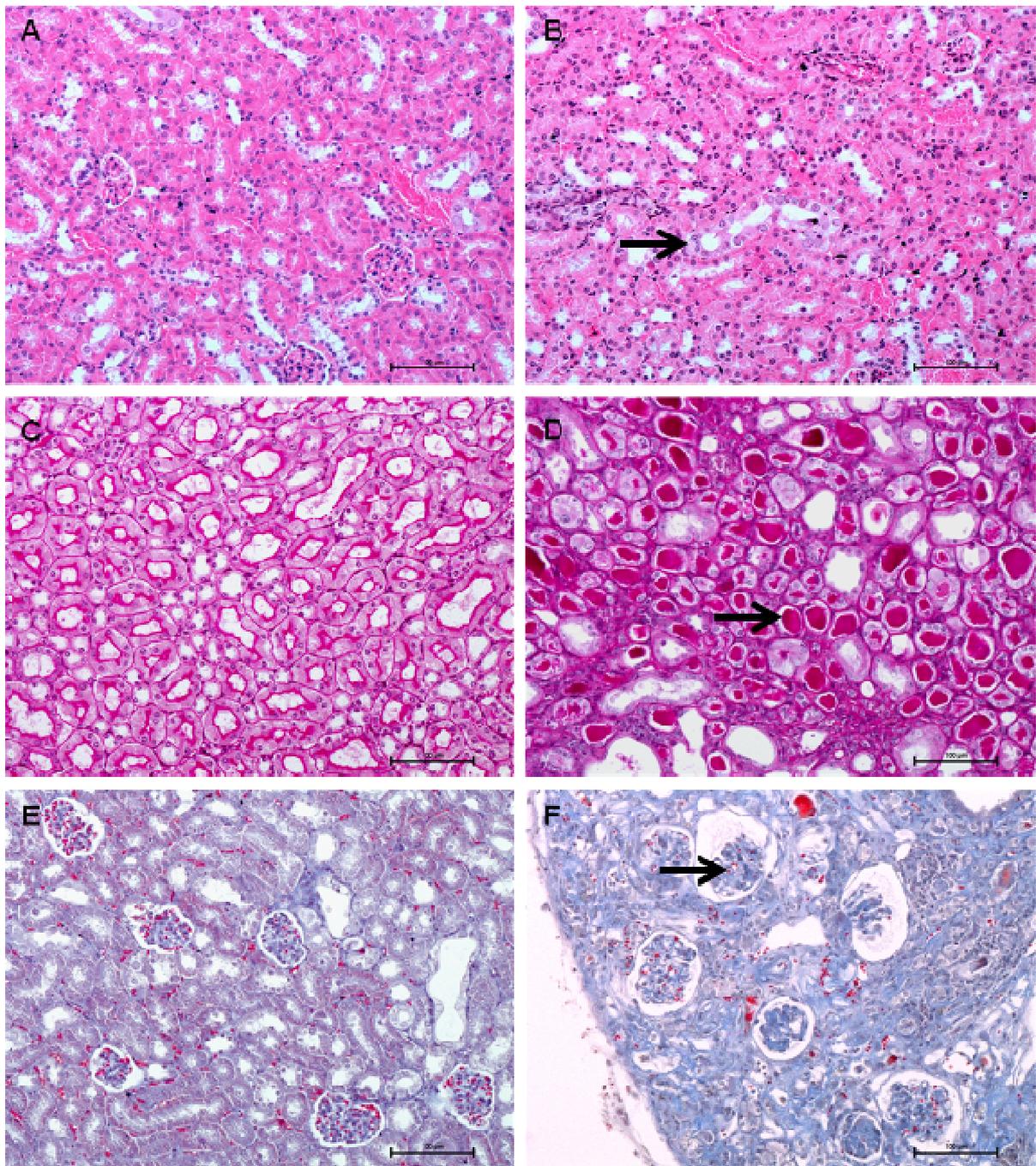
**Figure 11:** Grade of activity-related renal histological findings.

Activity-related increased karyomegaly, cytomegaly, proteinuria and glomerulosclerosis are noticed.



**Figure 12:** Comparison between kidney of control animals and kidney of animals injected with an activity of 11.1 MBq, 26 weeks after injection (B and F) or with 7.4 MBq, 35 weeks after injection (D).

Control kidney, Hemalun-Eosin-Saffron (A), Periodic Acid Schiff (C), and Masson's trichrome (E), x400 (bar = 100  $\mu\text{m}$ ). Injected kidneys showing basophilic tubules, karyomegaly and cytomegaly (B, arrow), HES, x400, proteinaceous casts (D, arrow), PAS x 400, and glomerulosclerosis (F, arrow), MT, x40.

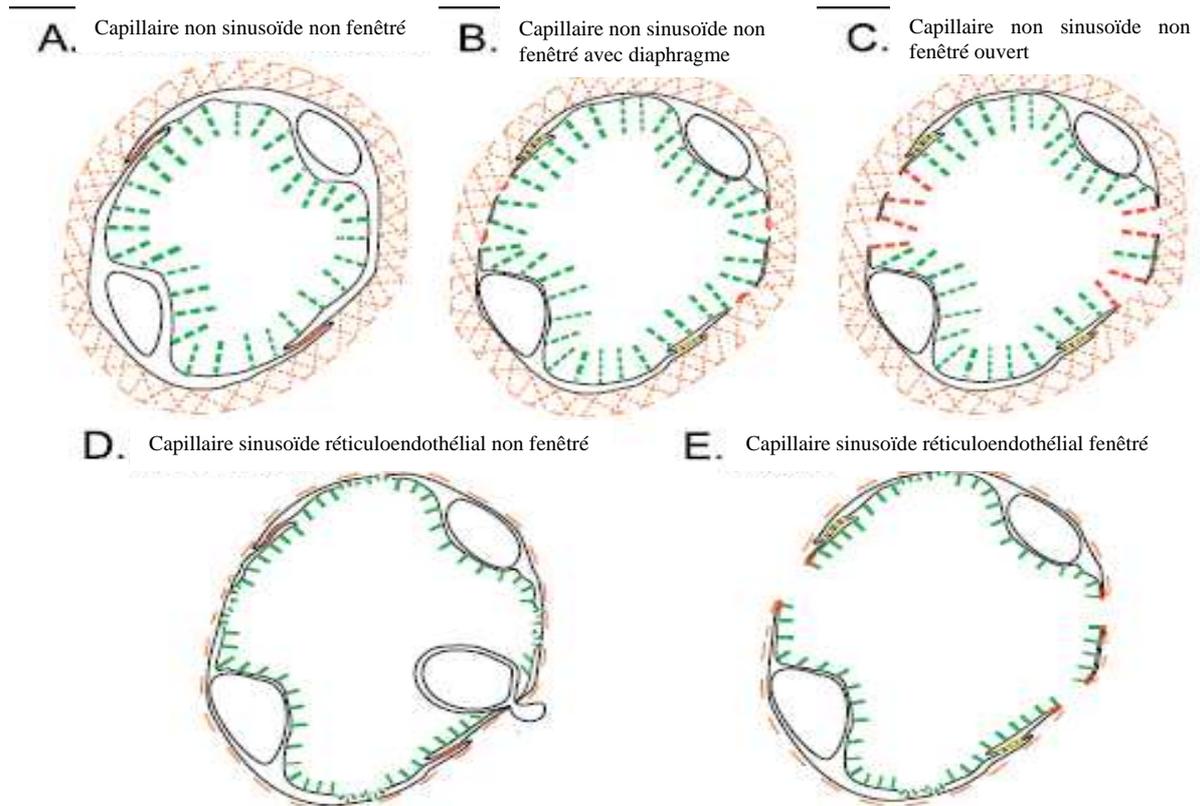


### **III- Conclusions de la première partie**

L'objectif de cette première partie consiste à évaluer la toxicité aiguë et chronique intrinsèque du  $^{213}\text{Bi}$  couplé à la BSA et à deux anticorps non spécifiques (OKT3 et 6H4) chez la souris et à établir une activité injectée maximum sans effets adverses, utilisable en RIT alpha dans des modèles murins.

#### *Discussion sur la biodistribution*

Peu de données sont disponibles concernant l'évaluation des effets des rayonnements ionisants sur les cellules normales quiescentes, vraisemblablement car ce type de cellules est difficile à maintenir en culture. Cette étude permet un suivi de la fonction des organes *in vivo* confirmé par un examen histologique des tissus irradiés. Les données disponibles sur la radiotoxicité sont issues d'études portant sur des irradiations externes, concernant le corps entier, le plus souvent utilisant des rayonnements  $\beta$  ou  $\gamma$ . Dans ce contexte, l'irradiation présente une distribution homogène, à haut débit de dose, limitée dans le temps de fractions parfaitement définies d'énergie. Ces caractéristiques ne sont pas transposables à une RIT utilisant des rayonnements  $\alpha$ , agissant par une irradiation délivrée en continu, à débit de dose bas et variable, à partir d'une source répartie de façon hétérogène. Dans notre étude, le radioimmunoconjugué est administré par voie intraveineuse et séjourne dans le torrent circulatoire, tous les organes normaux sont donc irradiés à partir du volume sanguin. La perméabilité microvasculaire aux macromolécules est dépendante du type de vascularisation, des conditions physiologiques ou pathologiques et de l'existence de récepteurs spécifiques au niveau de l'endothélium vasculaire. En effet, le foie, la moelle osseuse hématopoïétique et la rate sont constitués d'une vascularisation capillaire de type sinusoïde, très perméable et très abondante, contrairement au rein possédant une vascularisation capillaire de type fenêtré (moyennement perméable) ou au cerveau présentant une vascularisation capillaire de type continu (peu perméable) (**Figure 4 et tableau VI**).



**Figure 4 : Ultrastructure des différents types de capillaires sanguins**

Les piliers verts émanant de la surface luminale de l'endothélium représentent les fibres individuelles de mucopolysaccharides du glycocalyx endothélial. La région hachurée orange entourant la surface abluminale représente la membrane basale. (d'après [185]).

**Tableau VI: Classification et propriétés des différents types de capillaires sanguins**

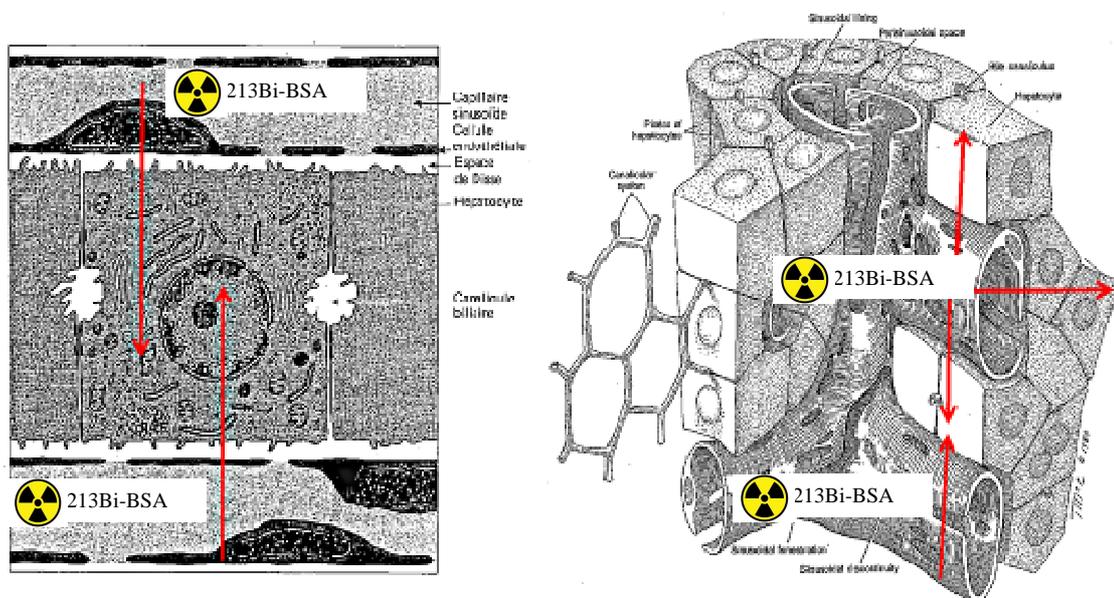
(D'après [185])

Type de capillaire	Localisation	Membrane basale	Glycocalyx	Voie de passage des molécules	Taille des pores	Cellules endothéliales
Non sinusoïde non fenêtré	Encéphale, nerf, moelle épinière	Continue	Épais : 150-400 nm	Fentes interendothéliales	Zona occludens < 1 nm	Couche continue
	Muscle, os, tissu adipeux, peau, poumon	Continue	Épais : 150-400 nm		Macula occludens 5 nm	Couche continue
Non sinusoïde fenêtré	Tissu conjonctif, intestin	Continue	Épais : 150-400 nm	Diaphragmes	Diaphragmés 6-12 nm	Présence de fenestrations
	Glomérule rénal	Continue	Épais : 150-400 nm	Fenestrations	Ouverts 15 nm	Présence de fenestrations
Sinusoïde réticuloendothélial non fenêtré	Moelle osseuse hématopoïétique	Discontinue	Fin	Fentes interendothéliales	Macula occludens 5 nm	Couche continue
Sinusoïde réticuloendothélial fenêtré	Foie, rate	Discontinue	Absent au niveau des fenestrations	Fenestrations	Homme : 50-180 nm Rongeurs : 50-280 nm	Présence de fenestrations

*Discussion sur la toxicité observée*

Le  $^{213}\text{Bi}$  couplé à la BSA présente principalement une toxicité hépatique à moyen terme (à l'activité injectée de 11.1 MBq) et une toxicité rénale à long terme (à l'activité injectée de 7.4 MBq), ainsi qu'une toxicité hématologique précoce, transitoire mais réversible, quelle que soit l'activité injectée.

Ce travail est actuellement la seule étude montrant que les particules  $\alpha$  occasionnent une toxicité hépatique avérée à fortes activités injectées sur le long terme chez les souris. En termes de survie, cette étude révèle une mort prématurée de l'ensemble des souris injecté avec une activité 11.1 MBq. Ce fort taux de mortalité est attribuable à une dysfonction hépatique, toutes ces souris présentant une augmentation de l'activité plasmatique des transaminases avant leur mort. Cette toxicité hépatique peut être expliquée par la structure du foie et par le mode d'action des rayonnements  $\alpha$ . En effet, les hépatocytes sont des cellules de 30 à 40  $\mu\text{m}$  de diamètre, agencées en cordons unicellulaires, bordés de part et d'autre par un endothélium vasculaire de type sinusoïde, de 5 à 10  $\mu\text{m}$  de diamètre. Il est donc peu probable que les hépatocytes échappent à une irradiation à partir du volume sanguin par des particules  $\alpha$  dont le trajet est compris entre 50 et 80  $\mu\text{m}$  (**Figure 5**).



**Figure 5 : Irradiation des hépatocytes à partir du volume sanguin**

Le travail de Bethge faisait déjà état de l'observation de dysfonctionnement hépatique chez le chien, suite à une RIT utilisant un anticorps anti-TCR $\alpha\beta$  couplé au  $^{213}\text{Bi}$ , dans une gamme d'activité injectée similaire [20]. De même, Jurcic rapporte des dysfonctions hépatiques chez 22% des patients traités avec un anti-CD33 couplé au  $^{213}\text{Bi}$  (hyperbilirubinémie et augmentation de l'activité plasmatique des PAL, ASAT et ALAT) [106]. Il apparaît donc que la toxicité hépatique des particules  $\alpha$  ait été constatée chez plusieurs espèces animales.

La toxicité rénale apparaît tardivement (300 jours après injection) pour les souris injectées avec une activité de 7.4 MBq. Cependant, bien que des lésions histologiques tubulaires, glomérulaires et interstitielles soient observées, aucune différence statistiquement significative n'a pu être mise en évidence entre les souris témoins et les souris injectées.

La toxicité hématologique observée se caractérise par une diminution précoce mais transitoire des leucocytes et des thrombocytes sanguins. Cependant, la numération cellulaire revient aux valeurs physiologiques entre J14 et J25 après injection, selon l'activité injectée. Il semblerait donc qu'une partie des progéniteurs médullaires soient épargnés par l'irradiation  $\alpha$  à partir du volume sanguin. La persistance de 5% des cellules progénitrices hématopoïétiques est suffisante pour assurer le repeuplement cellulaire par des cellules différenciées [70]. De plus, les cellules hématopoïétiques ne sont pas distribuées de façon uniforme au sein de la moelle osseuse : il existe un gradient spatial des cellules hématopoïétiques matures et des progéniteurs. Les progéniteurs hématopoïétiques sont situés à proximité des trabécules osseuses, dans la région endostéale alors que les cellules matures, plus différenciées, sont principalement localisées dans la région médullaire centrale [158]. Une étude de Watchman, portant sur la moelle osseuse hématopoïétique de la crête iliaque de la souris, montre que 11% des cellules hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> (progéniteurs) sont localisées dans les 50 premiers micromètres adjacents aux vaisseaux sanguins, 18.5% sont localisées entre 50 et 100  $\mu\text{m}$  des vaisseaux et 70% sont localisées entre 100 et 500  $\mu\text{m}$  [217]. Cette même équipe a montré une distribution relativement semblable au niveau de la moelle osseuse hématopoïétique des côtes et de la vertèbre L1 [24]. Le trajet des particules  $\alpha$  étant de 50 à 80  $\mu\text{m}$ , il est donc concevable que les précurseurs hématopoïétiques soient épargnés par les particules  $\alpha$  irradiant à partir du compartiment sanguin. Les mégacaryocytes, quant à eux, se développent

au niveau de la surface adventitielle des sinus vasculaires médullaires et sont donc plus exposés, ce qui tend à expliquer la thrombocytopénie observée [158].

Cette étude met également en lumière le fait que la toxicité médullaire ne constitue pas un facteur limitant à l'utilisation des particules  $\alpha$ , en accord avec les résultats obtenus par l'équipe de Behr [16]. Pour les souris injectées avec une activité de 3.7 MBq, une légère augmentation des paramètres reflétant les fonctions hépatiques et rénales est observée, mais elle s'avère statistiquement non significative par rapport aux témoins. Une RIT alpha est donc concevable chez la souris à une activité injectée de 3.7 MBq ( $^{213}\text{Bi}$ ) avec un vecteur de type macromolécule (comme les immunoglobulines). Ce propos doit cependant être modulé par le fait que, dans cette étude, le  $^{213}\text{Bi}$  a été couplé à la BSA (vecteur non spécifique). Dans le cadre d'une thérapie, le  $^{213}\text{Bi}$  est destiné à être couplé à un anticorps spécifique. Cet anticorps peut présenter une certaine toxicité propre (c'est le cas par exemple des anticorps anti-CD45), qui peut être potentialisée par le radionucléide. Des études d'évaluation de la toxicité à long terme doivent donc être envisagées au cas par cas, selon le couple anticorps/radionucléide étudié.

Dans la suite de ce travail, cette activité de 3.7 MBq sera donc retenue pour les essais thérapeutiques utilisant différents anticorps couplés au  $^{213}\text{Bi}$ , que ce soit dans le cadre du ciblage vasculaire (anticorps anti-CD105) ou dans le cadre du ciblage de cellules tumorales d'origine hématopoïétique (anticorps anti-CD138 ciblant les cellules tumorales du myélome multiple).

## **Deuxième partie : Radioimmunothérapie alpha et ciblage de l'endothélium tumoral**

L'objectif de cette deuxième partie est d'évaluer dans un premier temps, la pertinence d'un antigène, le CD105, dans le ciblage des cellules endothéliales tumorales. Cet antigène, très prometteur, sera couplé dans un deuxième temps au  $^{213}\text{Bi}$  et à l' $^{211}\text{At}$  et son efficacité antitumorale sera estimée.

### **I- Particularités de la vascularisation tumorale**

#### **A- Rôle de la néovascularisation lors du processus tumoral**

##### **1- Néovascularisation et établissement de la tumeur**

Lorsqu'une tumeur atteint un diamètre critique (de l'ordre de 2 mm), elle a besoin, pour se développer davantage, de déclencher une réponse angiogénique dans le tissu environnant. Les travaux de Folkman, dès 1971, mettent en évidence le fait que la croissance tumorale est étroitement tributaire de la vascularisation. La néovascularisation permet d'approvisionner les cellules tumorales en nutriments et en oxygène, ainsi que de prendre en charge les déchets du métabolisme cellulaire. L'hypoxie tumorale est à l'origine du basculement angiogénique qui déplace l'équilibre des facteurs pro-angiogéniques et antiangiogéniques en faveur de l'angiogénèse. C'est à cette étape que les cellules endothéliales changent de profil d'expression [75]. La néovascularisation résultante est associée à une croissance plus rapide et à une invasion locale. Une augmentation de l'angiogénèse est, de plus, associée à un risque accru de métastases [218]. La survie et le développement des tumeurs solides sont donc étroitement dépendants de l'angiogénèse.

## **2- Néovascularisation et pronostic**

L'intensité de la vascularisation d'une tumeur est reflétée par la mesure de la densité microvasculaire intratumorale. La corrélation positive entre une forte densité microvasculaire intratumorale et un pronostic péjoratif (diminution du taux de survie ou augmentation du risque métastatique) a été mise en évidence dans de nombreux cancers (cancers du sein, du poumon, de la prostate, de la vessie, du rectum, de la tête et du cou ainsi que dans le mélanome, le myélome multiple, les cancers des tissus mous ou encore ceux du système nerveux central) [218]. Les cellules endothéliales, en plus d'assurer par l'angiogénèse la nutrition des cellules tumorales, produisent également des facteurs de croissance nécessaires à la croissance tumorale comme le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), les IGFs (Insulin Growth Factors), le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) ou encore le GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) [94]. Leur rôle dans la croissance tumorale est donc capital. De plus, les cellules endothéliales activées sécrètent de nombreux facteurs de croissance ayant une action paracrine : collagénases, urokinases et activateur du plasminogène. Ces molécules favorisent la pénétration et la diffusion des cellules tumorales dans la matrice extracellulaire, le tissu conjonctif du stroma ainsi qu'au travers des vaisseaux lymphatiques et sanguins. Cela favorise ainsi la migration cellulaire, l'extension métastatique de la tumeur, et aggrave le pronostic [219].

## **B- Caractéristiques des vaisseaux tumoraux**

### **1- Classification des vaisseaux tumoraux**

Jain soumet une classification des vaisseaux intratumoraux en 9 catégories. Les 7 premières catégories de vaisseaux sont aussi bien présentes au niveau du tissu normal qu'au niveau du tissu tumoral [102]. Il s'agit :

- des artères et artérioles,
- des capillaires continus, bordés par un endothélium intact continu, soutenu par une membrane basale et constitués de cellules endothéliales possédant des jonctions serrées,

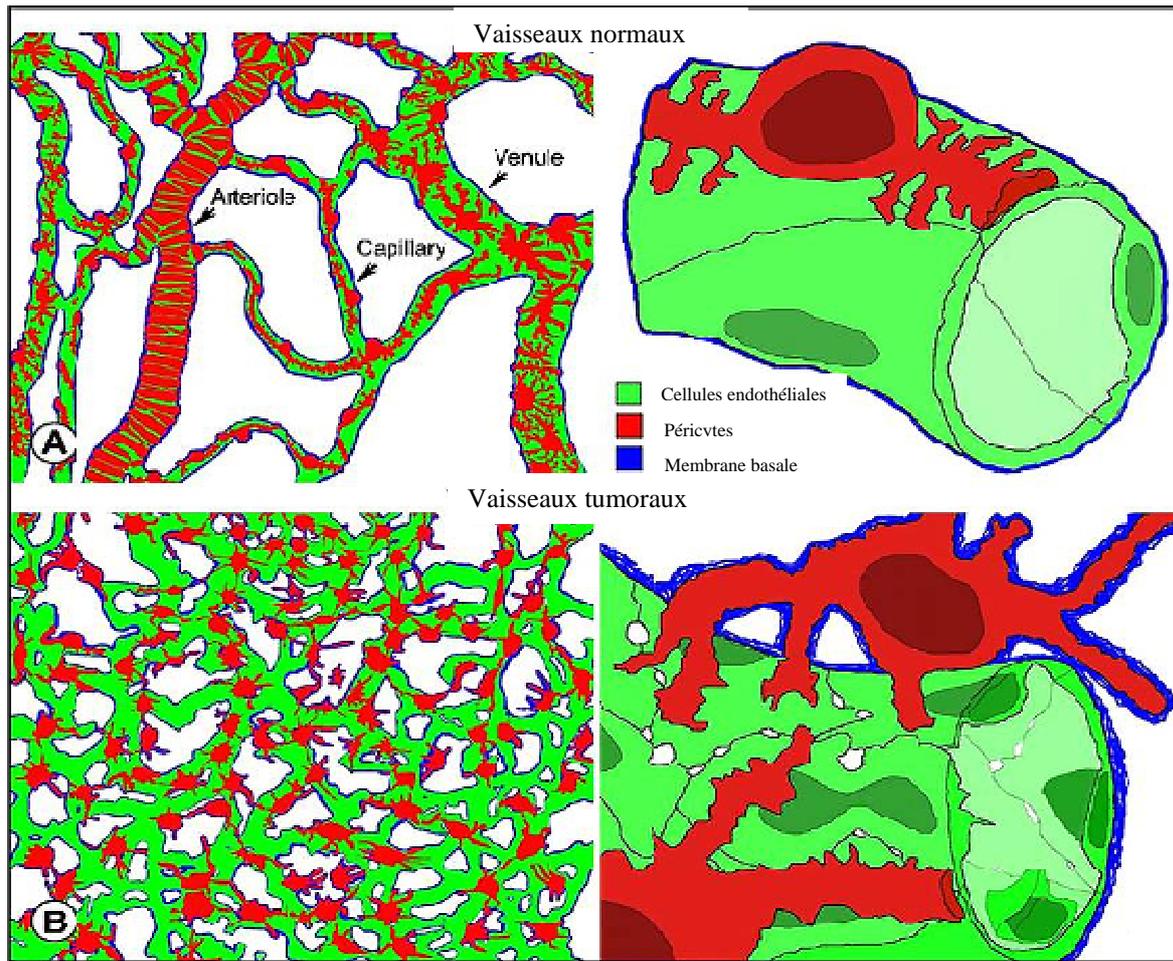
- des capillaires fenêtrés, bordés par un endothélium discontinu et une basale continue,
- des capillaires discontinus ou sinusoïdes, bordés par un endothélium et une basale discontinus, dont les cellules endothéliales ménagent des espaces entre elles,
- de veinules post-capillaires, très tortueuses et de large diamètre. Au sein du tissu tumoral, ces dernières sont dépourvues de membrane basale, contrairement aux veinules post-capillaires des tissus normaux,
- des veines et veinules d'architecture tortueuse et sacculaire, fréquemment dilatées,
- d'anastomoses artérioveineuses, permettant un shunt entre le système artériel et le système veineux, plus fréquentes et plus systématiques dans les tissus tumoraux que dans les tissus normaux.

Les 2 autres catégories de vaisseaux sont présentes uniquement au sein du tissu tumoral. Il s'agit :

- de vaisseaux sanguins non bordés par un endothélium,
- de bourgeons capillaires.

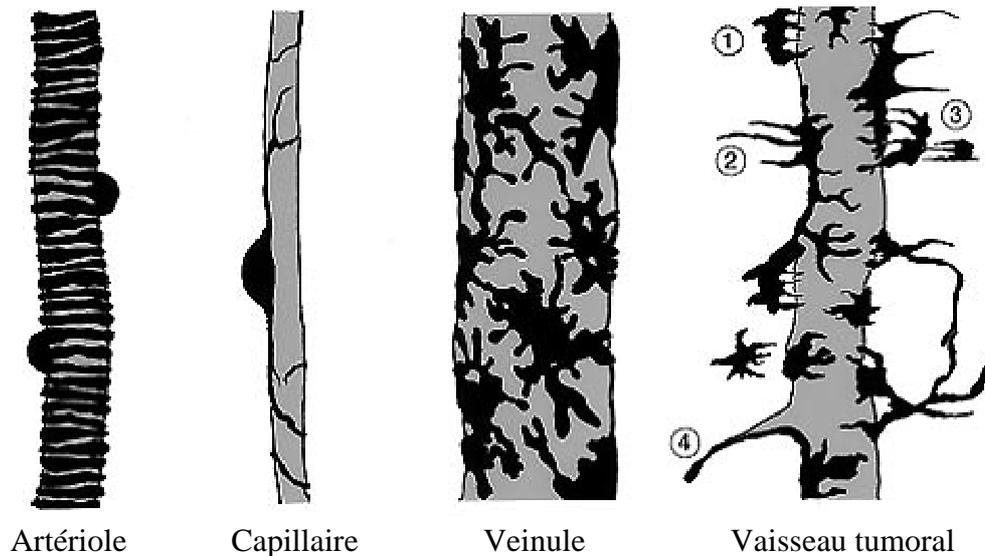
## 2- Modifications du flux sanguin intratumoral

Les vaisseaux normaux présentent une hiérarchie morphologiquement identifiable d'artérioles, de veinules et de capillaires caractérisés par une taille, une forme et une structure pariétale propres. Les artérioles sont pourvues d'une couche de muscle lisse, les capillaires et les veinules sont pourvus de péricytes (**Figure 6**). Les cellules musculaires lisses des artérioles sont relativement uniformes, arrangées de manière circonférentielle, proches les unes des autres et étroitement associées à l'endothélium. Les péricytes des capillaires sont orientés longitudinalement par rapport au vaisseau, possèdent de longs et fins prolongements cytoplasmiques, sont étroitement liés aux cellules endothéliales, mais ne couvrent qu'une petite portion de la surface vasculaire. Les péricytes des veinules sont de forme irrégulière, étroitement associés aux cellules endothéliales et recouvrent une grande partie de la surface de la veinule (**Figure 7**).



**Figure 6 : Comparaison structurale entre vaisseaux normaux et tumoraux**  
(D'après [10]).

Les vaisseaux intratumoraux présentent des caractéristiques qui leur sont propres et qui jouent un rôle fondamental dans la physiopathologie tumorale [10, 61] (**Figure 6**). Les vaisseaux intratumoraux sont de diamètre, de forme et de structure irréguliers et présentent de nombreuses anastomoses anarchiques. Ils sont peu différenciés et les artérioles, veinules et capillaires ne sont plus distincts. Ces vaisseaux intratumoraux présentent une paroi fine et fragile, une absence de muscle lisse périvasculaire, une diminution du nombre de complexes de jonction intercellulaires et une membrane basale constituée, par endroit, de plusieurs couches [9]. Les péricytes présentent une forme anormale et sont associés moins étroitement aux cellules endothéliales (**Figure 7**). Ils ménagent ainsi des espaces et contribuent aux modifications de perméabilité des vaisseaux tumoraux [149].



**Figure 7 : Comparaison des cellules murales d'une artériole, d'un capillaire et d'une veinule avec un vaisseau intratumoral présentant des péricytes anormaux**

Les péricytes intratumoraux ne sont que très lâchement associés à l'endothélium (1), possèdent des prolongements cytoplasmiques s'étendant au-delà de la paroi vasculaire (2) (jusqu'à parfois recouvrir d'autres péricytes (3)) et accompagnent les bourgeons vasculaires, allant même au-delà de l'extrémité de ces bourgeons (4) (d'après [149]).

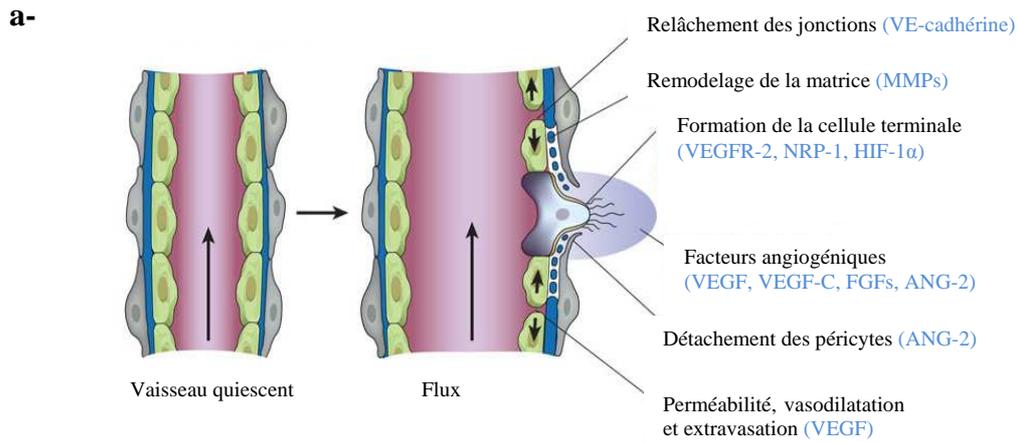
### 3- Conséquences sur les cellules tumorales

Les vaisseaux tumoraux présentent donc des particularités structurales, engendrant des particularités fonctionnelles. Nous avons vu précédemment que les vaisseaux tumoraux sont caractérisés par des modifications de leur perméabilité. Les vaisseaux tumoraux sont, de plus, tortueux et de fréquentes anastomoses anarchiques perturbent la circulation sanguine, contribuant à son ralentissement voire à sa stagnation. La pression interstitielle accrue au sein de la tumeur et la pression intravasculaire diminuée qui en résultent sont à l'origine de collapsus vasculaires contribuant également à une stase sanguine intratumorale. C'est pourquoi les cellules tumorales évoluent dans un microenvironnement relativement hypoxique. La grande hétérogénéité phénotypique et les particularités structurales des vaisseaux sanguins tumoraux ont fait l'objet de nombreuses études [10, 102, 118]. De ces études est né le concept de ciblage spécifique des vaisseaux tumoraux, basé sur leurs propriétés et sur les mécanismes de l'angiogénèse.

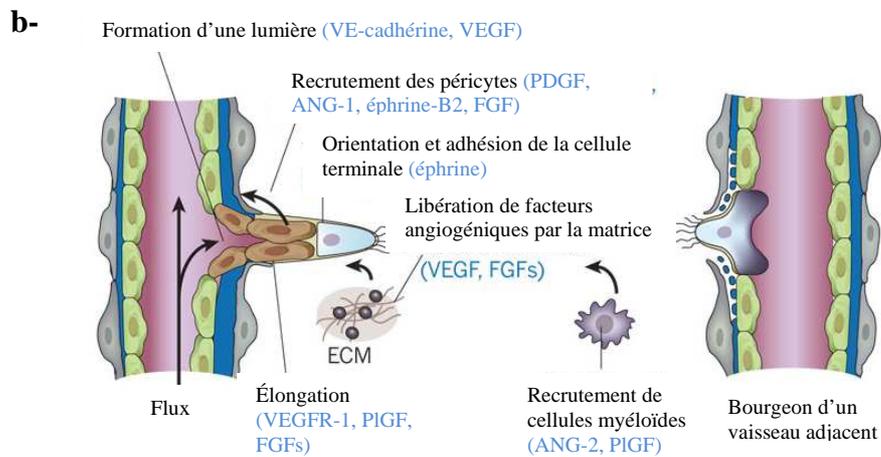
## C- Mécanismes de l'angiogénèse tumorale

### 1- Description du processus d'angiogénèse

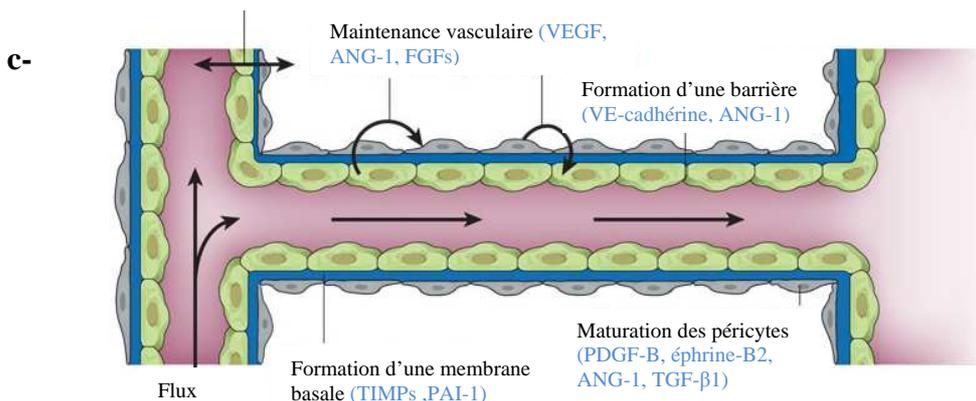
L'angiogénèse se caractérise par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins capillaires conduisant à une néovascularisation. Il s'agit d'un mécanisme complexe, nécessaire à la croissance tumorale et au développement de métastases [218]. Il fait intervenir une série d'étapes successives comprenant l'activation des cellules endothéliales par des facteurs de croissance spécifiques, la dégradation de la membrane basale vasculaire et de la matrice extracellulaire par des protéases activées, la migration et la prolifération des cellules endothéliales et enfin, la formation de bourgeons capillaires [35]. Dans un premier temps, après stimulation par des facteurs angiogéniques, les vaisseaux quiescents se dilatent et une cellule endothéliale terminale est sélectionnée pour assurer la connexion avec d'autres vaisseaux. La formation de cette cellule terminale requiert la dégradation de la membrane basale, le détachement des péricytes et la distension des jonctions des cellules endothéliales (**Figure 8a**). L'accroissement de la perméabilité qui en résulte permet aux protéines plasmatiques extravasées de se déposer sur une matrice provisoire. Des protéases remodelent la matrice interstitielle préexistante, facilitant la migration cellulaire, parmi lesquelles les métalloprotéinases de la matrice (MMPs) et l'uPA (urokinase Plasminogen Activator). Dans un second temps, la cellule endothéliale terminale s'oriente en réponse à des signaux chimiotactiques, adhère à la matrice extracellulaire et migre. Les cellules en amont prolifèrent, s'allongent et forment une lumière (**Figure 8b**). Dans un troisième temps, les bourgeons fusionnent pour établir un néovaisseau correctement perfusé. Les cellules en prolifération recrutent les péricytes et une membrane basale stable est synthétisée. Après la fusion des branches voisines, la formation d'une lumière permet la perfusion du néovaisseau qui revient à l'état quiescent en rétablissant des jonctions, une membrane basale, des péricytes matures et en produisant des signaux de maintien du vaisseau (**Figure 8c**) [35].



MMPs : matrix metalloproteinase, VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor, NRP1 : neuropilin-1, HIF-1 $\alpha$  : hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , FGF : fibroblast growth factor, ANG-2 : angiotensin-2



PDGF : p Transport transendothélial de lipide (VEGF-B)



TIMPS : tissue inhibitors of matrix metalloproteinase, TGF- $\beta$ 1 : transforming growth factor  $\beta$ 1, PAI-1 : plasminogène activator inhibitor-1

**Figure 8 : Étapes consécutives de l'angiogénèse bourgeonnante** (D'après [35]).

Une tumeur peut développer différents dispositifs pour assurer son approvisionnement en nutriments et en oxygène [35, 76] :

- des mécanismes non angiogéniques, lors desquels la tumeur présente la capacité de « parasiter » le stroma normal et les vaisseaux sanguins normaux pour ces propres besoins métaboliques,
  - de l'angiogénèse « bourgeonnante » classique (précédemment décrite) (**Figure 9a**),
  - de la vasculogénèse post-natale, lors de laquelle des précurseurs mésodermiques de cellules endothéliales dérivés de la moelle osseuse (les angioblastes) se logent dans la vascularisation tumorale, se différencient en cellules endothéliales et stimulent la néovascularisation tumorale en combinant vasculogénèse et angiogénèse conventionnelle (**Figure 9b**),
  - du remodelage vasculaire, lors duquel la pénétration de cellules tumorales dans les vaisseaux provoque leur scission (phénomène d'intussusception) et donne naissance à des vaisseaux-fils (**Figure 9c**). L'angiogénèse par intussusception est un processus rapide (de l'ordre de l'heure), ne requérant pas la prolifération des cellules endothéliales (**Figure 10**),
  - du recrutement, caractérisé par le détournement de la vascularisation préexistante par les cellules tumorales (**Figure 9d**),
  - du mimétisme vasculaire, lors duquel les cellules tumorales acquièrent des caractéristiques de cellules souches et bordent elles-mêmes le réseau capillaire (**Figure 9e**),
  - un recours à des cellules présentant des anomalies cytogénétiques sur leurs chromosomes, dérivées de potentielles cellules souches cancéreuses (**Figure 9f**).
- Contrairement aux tissus normaux qui n'utilisent que l'angiogénèse, la vasculogénèse et l'intussusception, les vaisseaux tumoraux peuvent mettre en œuvre ces six mécanismes pour former leur vascularisation propre.

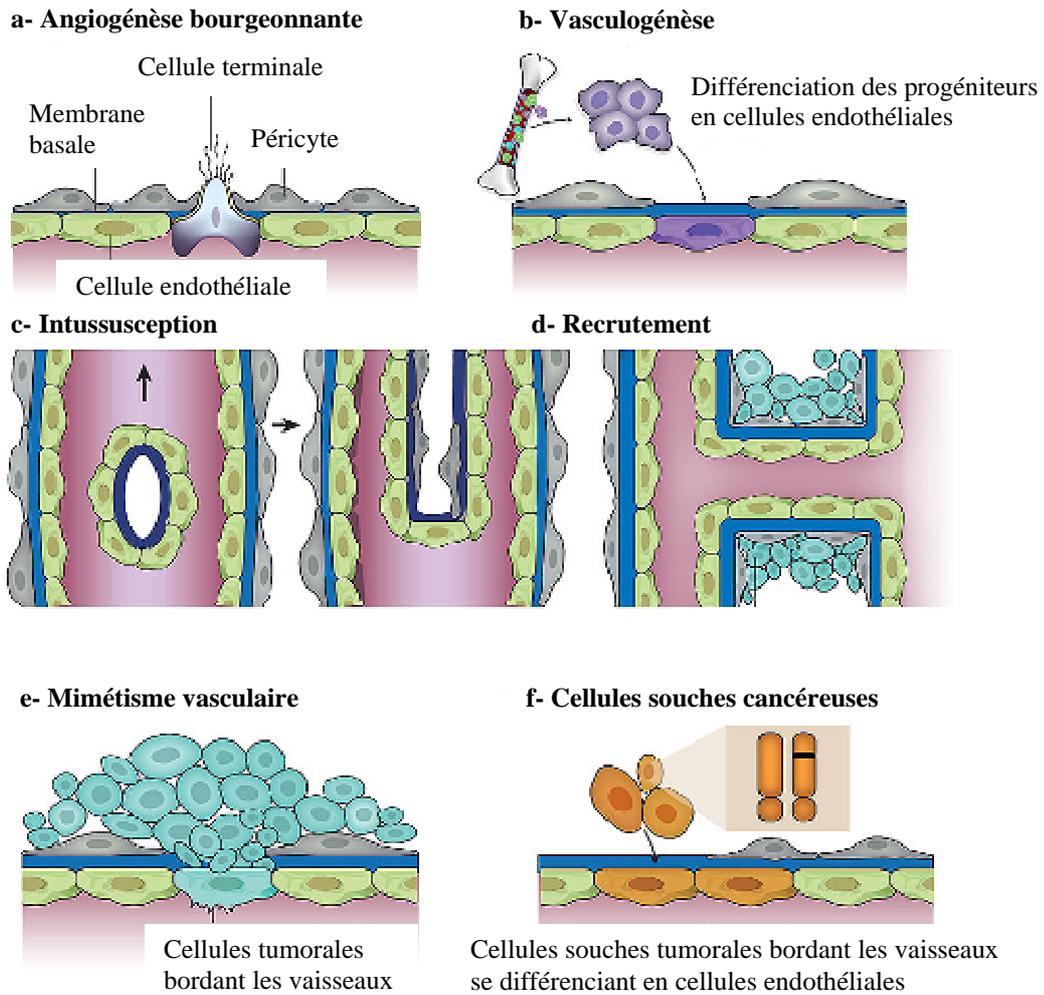


Figure 9 : Différents modes de formation de vaisseaux sanguins tumoraux

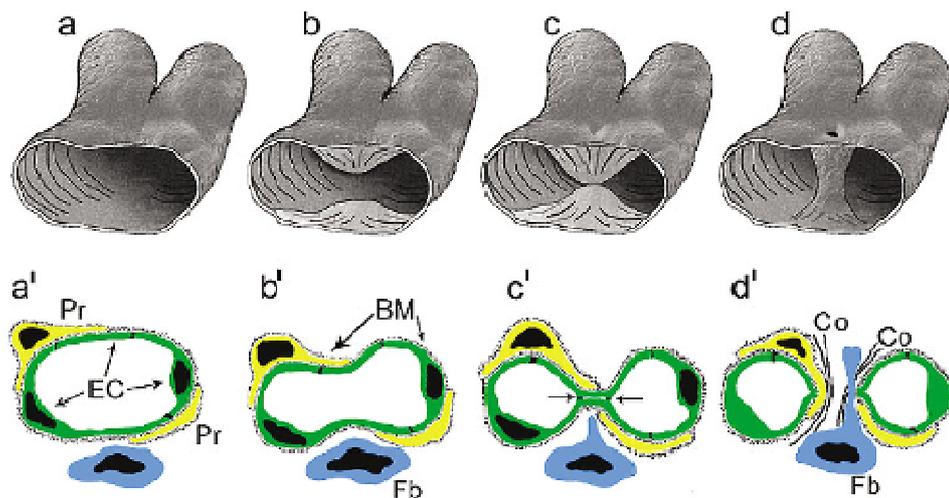


Figure 10 : Angiogénèse par intussusception

Ce processus se fait en quatre étapes. a (représentation en 3 dimensions), a' (représentation en 2 dimensions) : protrusion des cellules endothéliales (EC) de parois opposées dans la lumière vasculaire, b, b' : établissement d'un contact inter-endothélial, c, c' : un pilier central est formé, envahi ensuite par les péricytes (Pr) et les myofibroblastes (Fb), d, d' : le pilier augmente de diamètre, est colonisé par des fibres de collagène (Co) et les cellules endothéliales se rétractent, formant ainsi deux nouveaux vaisseaux (d'après [32]).

## 2- Mécanismes moléculaires gouvernant l'angiogénèse

Les cellules endothéliales nouvellement formées lors de l'angiogénèse tumorale subissent des altérations de l'expression de leurs molécules d'adhésion, de leurs récepteurs et d'autres protéines. Elles surexpriment également des marqueurs antigéniques, comme les VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptors) ou les intégrines ( $\alpha_V\beta_3$ , Delta-4). L'angiogénèse est placée sous le contrôle d'une myriade de facteurs solubles et non solubles, qui régulent la croissance et la différenciation des cellules endothéliales. Les facteurs solubles stimulateurs de l'angiogénèse les plus connus incluent la famille des VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), l'aFGF (acidic Fibroblast Growth Factor), le bFGF, le PDGF, la TP (Thymidine Phosphorylase), le TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ), le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ), l'IL-4 (Interleukine-4) et l'IL-8. Ces molécules sont sécrétées par les cellules endothéliales, les cellules tumorales ou encore par des cellules recrutées sur le site de l'angiogénèse (péricytes, macrophages, mastocytes et plaquettes) [202].

### a- La famille VEGF et ses récepteurs

#### *VEGF*

Cette famille de molécules pro-angiogéniques est la plus connue. Ce sont des médiateurs cruciaux de la vasculogénèse et de l'angiogénèse, tant physiologique que pathologique. Leur expression est intimement associée à la croissance des tumeurs solides et à la formation de métastases. La famille VEGF comprend VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E et PlGF (Placental Growth Factor). Ces molécules ont la capacité de se lier à la même classe de récepteurs, de type récepteurs tyrosine-kinases (**Tableau VII**) [202].

#### *Récepteurs au VEGF*

Les trois principaux récepteurs aux protéines de la famille VEGF qui ont été décrits sont : VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3. Le VEGFR-3 est restreint à l'endothélium lymphatique chez l'adulte mais est surexprimé au sein de

l'endothélium tumoral [205]. D'autres récepteurs de moindre importance sont également rapportés : NRP1 (Neuropilin 1) et NRP2, dont le rôle dans l'angiogénèse est plus complexe. Ce sont tous des récepteurs tyrosine-kinases. La liaison des protéines de la famille VEGF à ces récepteurs induit une dimérisation de ces récepteurs, une autophosphorylation et une transduction du signal via des voies de signalisation diverses comme MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) et AKT [202].

**Tableau VII : Rôles et récepteurs des différentes protéines de la famille VEGF**

<b>Protéine</b>	<b>Rôle</b>	<b>Récepteurs</b>
<b>VEGF-A</b>	Prolifération des cellules endothéliales Vasodilatation	VEGFR-1 VEGFR-2 NRP1 NRP2
<b>VEGF-B</b>	Prolifération des cellules endothéliales	VEGFR-1 NRP1
<b>VEGF-C</b>	Augmentation de la perméabilité vasculaire Migration et prolifération des cellules endothéliales	VEGFR-2 VEGFR-3 NRP2
<b>VEGF-D</b>	Prolifération des cellules endothéliales	VEGFR-2 VEGFR-3
<b>VEGF-E</b>	Prolifération des cellules endothéliales	VEGFR-2 NRP1
<b>PIGF</b>	Stimulation des progéniteurs endothéliaux médullaires	VEGFR-1 NRP1

#### b- Les angiopoïétines et le récepteur Tie-2

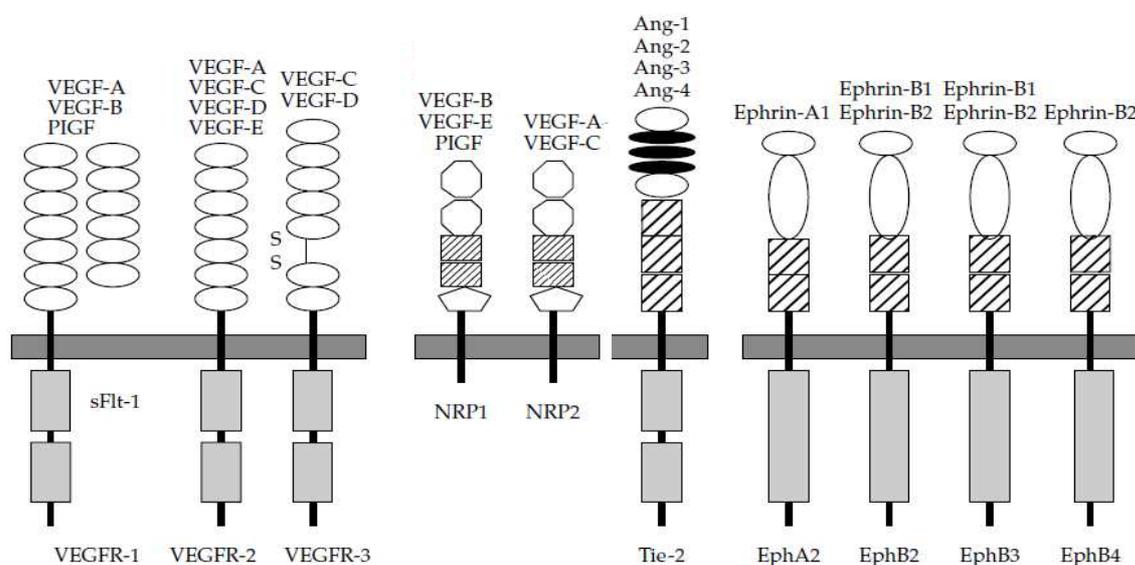
La famille des angiopoïétines est constituée de ligands (Ang-1, Ang-2, Ang-3 et Ang-4) se liant exclusivement aux récepteurs tyrosine-kinases Tek/Tie-2. Ang-1 et Ang-2 présentent des effets antagonistes sur les cellules endothéliales : Ang-1 stimule la phosphorylation de Tie-2 alors que Ang-2 l'inhibe. Ang-1 promeut la survie et la migration des cellules endothéliales et stabilise les vaisseaux néoformés en facilitant le recrutement des péricytes et d'autres cellules péri-endothéliales. Ang-2 bloque les effets stabilisateurs de Ang-1 [202].

#### c- Les récepteurs Eph et les éphrines

Leur rôle dans l'angiogénèse a été mis en évidence lors du développement de la vascularisation embryonnaire et par le fait que les souris knock-out pour

l'éphrine B2 présentent des anomalies du développement vasculaire. L'expression de l'éphrine A1 et de son récepteur EphA2 a été démontrée lors de l'angiogénèse tumorale. Les mécanismes gouvernant l'interaction entre le récepteur et son ligand ainsi que ces implications sont encore en cours d'investigation [202].

Les interactions entre les ligands de la famille du VEGF et les différents récepteurs tyrosine-kinases de la famille des VEGFR sont récapitulées en **figure 11**.



**Figure 11 : Interactions entre les ligands de la famille du VEGF et leurs récepteurs respectifs (D'après [202]).**

#### d- Les intégrines

La famille des intégrines est très étendue et est constituée de molécules d'adhésion de surface. La fonction principale des intégrines est de faciliter les interactions entre les cellules et les protéines de la matrice extracellulaire. Les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_v\beta_5$  contribuent à la survie, à la migration et à la prolifération des cellules endothéliales [202].

Ces mécanismes moléculaires gouvernant l'angiogénèse sont autant de cibles potentielles pour une thérapie antiangiogénique.

## **II- Ciblage de la vascularisation tumorale dans les thérapies anticancéreuses**

Différentes approches ont été développées afin de détruire la vascularisation tumorale et d'inhiber l'angiogénèse soit directement, par le ciblage de protéines ou de récepteurs liés à la membrane, soit indirectement, par le ciblage de facteurs de croissance solubles. Bien que la cellule endothéliale soit la principale cible de ces thérapies, l'effet antiangiogénique peut également être obtenu en ciblant les stimulateurs angiogéniques, les protéines de la matrice extracellulaire ou les mécanismes de contrôle de l'angiogénèse.

### **A- Les inhibiteurs naturels de l'angiogénèse**

Les cellules tumorales elles-mêmes peuvent produire des molécules antiangiogéniques. L'angiogénèse tumorale est la résultante d'un équilibre entre molécules pro- et antiangiogéniques au sein de la tumeur. Les principales molécules antiangiogéniques sont l'angiostatine, l'endostatine et la thrombospondine-1.

#### **1- Angiostatine**

L'angiostatine est la première molécule identifiée pour ses capacités antiangiogéniques. Elle inhibe la prolifération, la migration des cellules endothéliales et la formation de tubes. Elle peut agir comme inhibiteur circulant, à distance du site tumoral primaire. L'administration d'angiostatine à des souris permet la régression de la tumeur primaire et prévient la vascularisation et la croissance des métastases [31]. Cette molécule a fait l'objet d'un essai clinique de phase II sur des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules [117].

## **2- Endostatine**

L'endostatine inhibe la prolifération des cellules endothéliales, la croissance de la tumeur primaire mais également l'établissement et la croissance des métastases. Chez des souris greffées avec des cellules de mélanome B16F10, l'endostatine exerce une action synergique avec l'angiostatine [187]. L'endostatine est la première molécule à avoir été testée dans des essais cliniques, actuellement en phase I et en phase II dans le cadre du cancer du sein [107].

## **3- Thrombospondine-1**

La thrombospondine-1 est un inhibiteur de la prolifération, de l'adhésion, de la migration et de la morphogénèse des cellules endothéliales. Son niveau d'expression est inversement corrélé à la survie dans de nombreux cancers (thyroïde, colon et vessie) [48]. Un essai clinique de phase II a été réalisé sur des patients atteints de carcinome rénal. Cependant, utilisé en monothérapie, l'ABT-510 (un peptide analogue de la thrombospondine-1) n'a pas démontré d'activité anticancéreuse convaincante [59].

## **4- Inhibition de la dégradation de la matrice extracellulaire**

Ces molécules inhibent la protéolyse de la matrice extracellulaire, préalable à l'angiogénèse, notamment en inhibant l'uPA ou les MMPs. Parmi elles, le marimastat (phase II pour le cancer du pancréas [66]) et le neovastat (phase III pour le cancer du poumon non à petites cellules [127]).

## **B- Ciblage spécifique de l'angiogénèse**

### **1- Ciblage des peptides pro-angiogéniques**

Le bevacizumab (Avastin®) est le premier inhibiteur de l'angiogénèse à avoir été développé et utilisé en clinique. Il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé

anti-VEGF-A. La liaison du bevacizumab au VEGF-A inhibe sa fixation à son récepteur, situé à la surface des cellules endothéliales. En outre, le bevacizumab prévient l'augmentation de perméabilité induite par le VEGF-A ainsi que la migration et la prolifération des cellules endothéliales. En dépit de ses effets secondaires (perforation gastro-intestinale, complications de cicatrisation, hémorragies, thrombo-embolies artérielles, neutropénie et infection, syndrome néphrotique, insuffisance cardiaque congestive et hypertension), le bevacizumab a été approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) en février 2004 dans le cadre du traitement du cancer colorectal, en combinaison avec le 5-fluorouracil [183]. Il est encore utilisé aujourd'hui pour d'autres applications (cancer du sein, cancer du poumon, glioblastome multiforme, carcinome rénal métastatique) [61]. Le thalidomide est l'inhibiteur d'angiogénèse le plus récemment approuvé par la FDA (mai 2006). Il cible le bFGF-2, peptide interagissant avec des héparane-sulfates et des récepteurs tyrosine-kinases au FGF sur les cellules endothéliales. Le thalidomide altère également l'expression des molécules d'adhésion des cellules endothéliales. La principale indication du thalidomide est le traitement des patients atteints de myélome multiple (en combinaison avec la dexaméthasone) [119]. Les effets indésirables du thalidomide sont bien connus : tératogénicité, mortalité intra-utérine et thrombo-embolie veineuse.

## **2- Ciblage des récepteurs tyrosine-kinases**

Le sorafenib (Nexavar®) est un inhibiteur des VEGFR2 et 3, du PDGFR- $\beta$ , de Raf-1, du Flt3 et de KIT, approuvé pour le traitement du cancer rénal depuis décembre 2005 [61]. Des essais cliniques de phase III sont actuellement en cours portant sur le carcinome hépatocellulaire [30], le mélanome [69] et le cancer du pancréas [81]. Les effets secondaires les plus souvent rapportés sont une diarrhée, un syndrome mains-pieds, une alopécie, une anorexie et une perte de poids. Le sunitinib (Sutent®) est un inhibiteur de tyrosine-kinases (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , KIT et Flt3 entre autres), approuvé pour le traitement du cancer rénal et des tumeurs gastro-intestinales stromales depuis janvier 2006 [61]. Des essais cliniques de phase III sont actuellement en cours portant sur le cancer du sein [18], du pancréas [22] et du poumon [186]. Les effets secondaires les plus souvent rapportés sont une fatigue, une

hypertension, des nausées, une diarrhée et des saignements. Le semaxanib (SU5416®) est un inhibiteur du VEGFR2, actuellement évalué par des essais cliniques de phase II dans le cadre du traitement du mélanome [148].

### **3- Ciblage des molécules d'adhésion**

Un anti- $\alpha_V\beta_3$  (cilengitide, Vitaxin®) a été développé : les études de phase I démontrent une faible toxicité [88] et les études de phase II sont en cours [91]. D'autres molécules d'adhésion peuvent également être ciblées, comme le VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) ou l'E-sélectine.

### **4- Limites des thérapies antiangiogéniques**

Les thérapies antiangiogéniques peuvent avoir des répercussions négatives sur tous les tissus présentant une néovascularisation physiologique tels que l'utérus, le placenta, les plaques de croissance ou encore les tissus cicatriciels. Cependant ces tissus ne constituent pas la majorité des tissus d'un organisme adulte. Ce type de traitement ne s'attaque pas directement aux cellules tumorales et il est vraisemblable que la déprivation en oxygène et en nutriments ne détruit pas la totalité des cellules tumorales et que certaines d'entre elles soient maintenues à l'état de latence ou de dormance. Ceci représente un risque de rechute non négligeable, déjà observé lors de thérapies antiangiogéniques classiques, notamment avec les inhibiteurs des VEGFRs [58]. En outre, certaines tumeurs progressent indépendamment d'une néovascularisation, par infiltration et incorporation de vaisseaux préexistants. Ces tumeurs sont clairement moins sensibles aux thérapies antiangiogéniques [176]. Il est également important de noter qu'une thérapie ciblant les cellules endothéliales ne s'attaque pas à la membrane basale vasculaire. Cette dernière, en servant de trame, peut être à l'origine d'une revascularisation de la tumeur [10]. La majorité des cibles thérapeutiques se concentrent sur les cellules endothéliales en prolifération, il faut cependant admettre que l'endothélium tumoral est également constitué de cellules endothéliales quiescentes. Pour toutes ces raisons, les thérapies antiangiogéniques ne sont jamais utilisées seules mais en association avec

d'autres chimiothérapies cytotoxiques, ciblant directement les cellules cancéreuses.

## **C- Intérêts du ciblage de l'endothélium tumoral**

Le concept de thérapie ciblant la vascularisation tumorale a été proposé originellement par Folkman en 1971 et a été ensuite adopté et développé par Denekamp, dans les années 80, notamment comme thérapie adjuvante aux thérapies anticancéreuses traditionnelles. Cette thérapie antivasculaire vise à détruire les cellules endothéliales intratumorales afin de priver les cellules tumorales d'oxygène et de nutriments. Les avantages du ciblage des cellules endothéliales intratumorales sont détaillés ci-après.

### **1- Accessibilité**

Les cellules endothéliales intratumorales sont situées à l'interface entre le torrent circulatoire et la tumeur. Elles sont donc plus accessibles aux thérapies délivrées par voie intravasculaire que les cellules tumorales elles-mêmes. Les tumeurs, notamment les tumeurs solides, présentent une forte pression interstitielle limitant l'accès et la distribution de macromolécules thérapeutiques. Cette faible pénétration est également imputable à la forte densité cellulaire des tumeurs, à leur stroma fibreux dense et à l'absence de drainage lymphatique efficace dans la majorité des tumeurs solides, contribuant à l'élévation de la pression interstitielle au sein de la tumeur. Le ciblage des cellules endothéliales permet donc de s'affranchir de tous les problèmes liés à la diffusion des molécules thérapeutiques au sein de la tumeur [1].

### **2- Amplification**

La mort d'une cellule endothéliale aboutit à la dénudation de l'endothélium vasculaire, exposant la matrice sous-endothéliale et initiant ainsi la cascade de la coagulation par l'activation des voies intrinsèque et extrinsèque. Il s'ensuit alors la formation d'un thrombus qui peut être occlusif. Le ciblage des cellules

endothéliales des vaisseaux intratumoraux aboutit donc à la mort par ischémie des nombreuses cellules tumorales dépendant de ces vaisseaux pour leur approvisionnement en nutriments et en oxygène et pour la prise en charge de leurs déchets métaboliques [1]. Ainsi, une thérapie ciblant les cellules endothéliales ne détruit pas seulement les cellules portant l'antigène cible mais également les cellules tumorales en aval du vaisseau ainsi détruit, amplifiant ainsi son action par un effet de « cascade ».

### **3- Stabilité génétique**

Les cellules endothéliales intratumorales présentent une stabilité génétique et une relative homogénéité de leur phénotype antigénique, contrairement aux cellules tumorales [29]. Elles sont donc moins sujettes aux mécanismes d'échappement et de résistance aux drogues chimiothérapeutiques, généralement développés par les cellules tumorales [1]. Cependant, l'équipe de Hida décrit certaines anomalies cytogénétiques touchant les cellules endothéliales (aneuploïdie et centrosomes anormaux notamment), nuanciant quelque peu cette affirmation. Cette étude montre également que les cellules endothéliales forment une population hétérogène et non clonale [92].

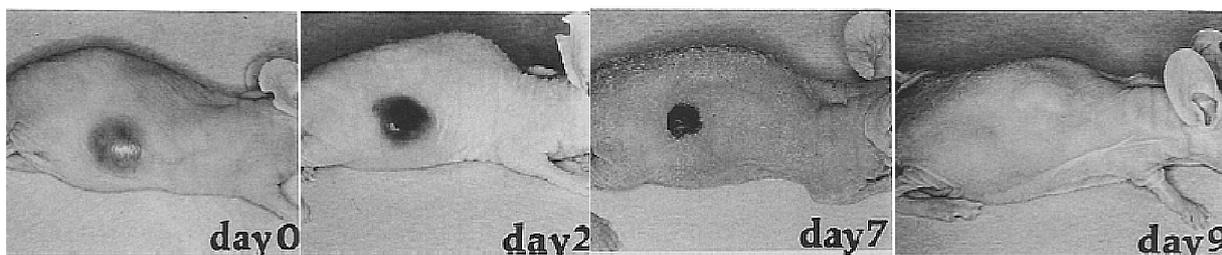
### **4- Thérapie non spécifique**

La quasi-totalité des tumeurs nécessite une néovascularisation pour assurer les besoins en nutriments et en facteurs de croissance. Elles sont donc potentiellement toutes redevables d'une thérapie ciblant leur vascularisation. Cependant, il est nécessaire de préciser que l'abondance de la néovascularisation n'est pas identique qu'il s'agisse de tumeurs solides (fort potentiel néoangiogénique) ou bien de tumeurs hématopoïétiques (faible potentiel néoangiogénique). Une thérapie ciblant spécifiquement les néovaisseaux sera donc plus efficace sur les tumeurs à fort potentiel néoangiogénique [33].

## 5- Pertinence du ciblage de l'endothélium tumoral

### a- Couplage d'une immunotoxine à un anticorps

Le ciblage de l'endothélium vasculaire a déjà fait ses preuves. Les expériences de l'équipe de Thorpe illustrent la validité du concept de ciblage vasculaire et justifient la recherche de marqueurs spécifiques de l'endothélium tumoral [210] (**Figure 12**).

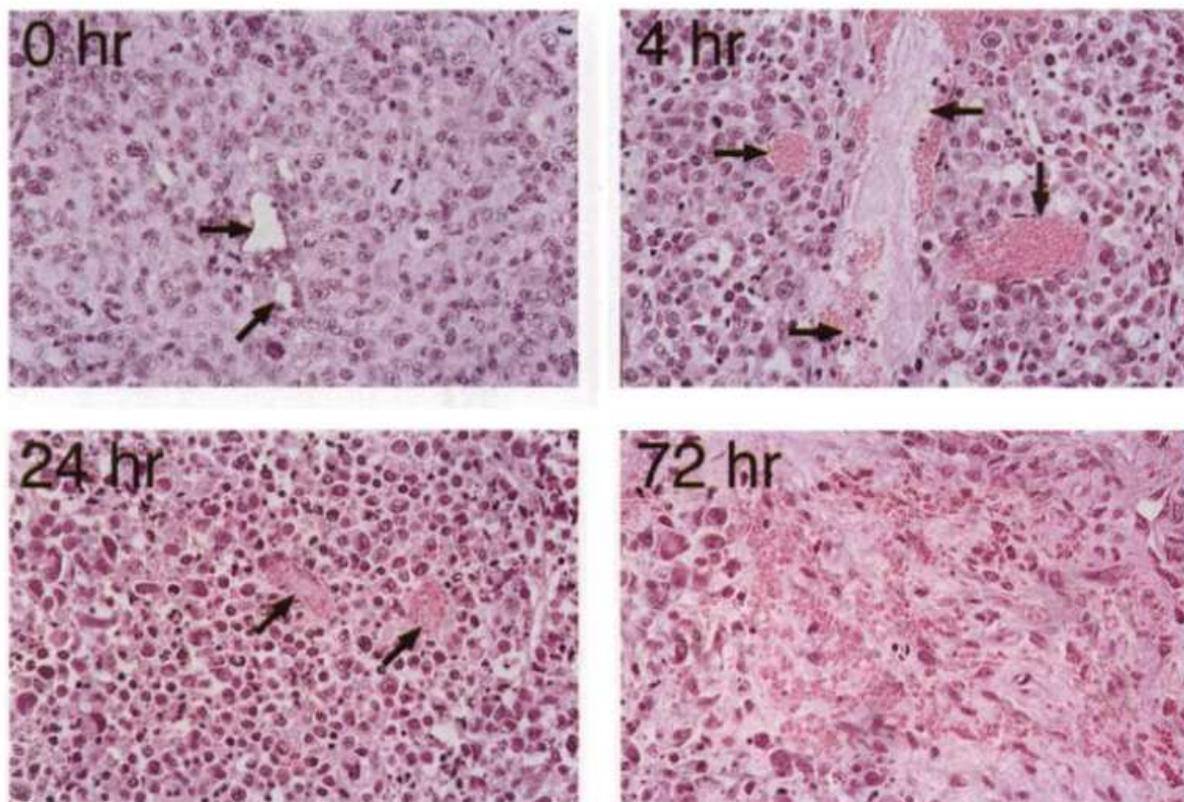


**Figure 12 : Aspect macroscopique de tumeurs sous-cutanées chez les souris traitées avec une immunotoxine dirigée contre la vascularisation tumorale**

Dans ce modèle, des cellules de neuroblastome transfectées avec le gène de l'IFN $\gamma$  murin sont implantées dans une souris Nude. L'IFN $\gamma$  sécrété par la tumeur induit l'expression d'antigènes du CMH de classe II au niveau de l'endothélium vasculaire tumoral exclusivement. Une seule injection d'une immunotoxine (la chaîne A de la ricine) couplée avec un anticorps anti-CMH de classe II chez des souris suffit à induire une thrombose complète de la vascularisation tumorale, un infarctus large et une régression tumorale remarquable. Le suivi des cellules tumorales dans le temps montre une première déperdition de cellules tumorales 2 heures après l'injection. Vers 5-6 heures, les vaisseaux intratumoraux sont complètement occlus par des thrombi et les premiers signes de nécrose de cellules tumorales apparaissent vers 8-12 heures. À 24 heures, les cellules tumorales sont pycnotiques et à 48 heures, une régression tumorale est macroscopiquement visible. À J2 après traitement, de massives hémorragies intratumorales provoquent une décoloration noire et à J7, la masse tumorale est réduite à un tissu cicatriciel correspondant à du tissu tumoral nécrotique (J9), d'après [210].

### b- Couplage du facteur tissulaire à un anticorps

Dans un deuxième temps, la même équipe a couplé un anticorps anti-VCAM-1 murin au domaine extracellulaire du facteur tissulaire humain, afin de provoquer une coagulation *in situ*, au niveau des vaisseaux tumoraux (notion de « coaguligand »). Après administration intraveineuse, le coaguligand entraîne une thrombose au niveau des vaisseaux intratumoraux, exprimant fortement le VCAM-1 [173] (**Figure 13**).



**Figure 13: Évolution des cellules tumorales après injection du coaguligand**

Dès 4 heures après injection du composé, les premiers thrombi commencent à se former. À 24 heures après injection, les cellules tumorales se détachent les unes des autres et leur noyau devient pycnotique. À 72 heures après injection, des zones de nécrose apparaissent. Ces thromboses occasionnent un ralentissement de la croissance tumorale [173].

#### c- Couplage d'un radionucléide à un anticorps

La RIT des tumeurs solides se heurte à deux principaux écueils. D'une part, seule une faible fraction de l'activité totale parvient à atteindre les cellules cibles, d'autre part, l'accumulation du radionucléide est souvent lente. Le ciblage de l'endothélium vasculaire dans le cadre d'une RIT permet de délivrer rapidement une plus grande fraction de l'activité totale. La seule étude ciblant l'endothélium vasculaire tumoral et démontrant la faisabilité et l'intérêt du ciblage vasculaire par RIT à l'aide d'un anticorps anti-thrombomoduline couplé au  $^{213}\text{Bi}$  est celle de Kennel. Dans cette étude, l'anticorps utilisé est dirigé contre la thrombomoduline murine (anticorps 201B). Bien que la thrombomoduline ne soit pas exprimée de façon spécifique par les vaisseaux tumoraux (elle est également fortement exprimée à la surface des capillaires et de vaisseaux sanguins de faible diamètre au niveau du poumon normal), cette étude montre l'augmentation du pourcentage

de survie de souris préalablement xénogreffées en IV avec des cellules de carcinome trachéal de rat. Cet effet est obtenu après administration intraveineuse de 5.02 MBq (136  $\mu$ ci) de  $^{213}\text{Bi}$ -201B [110]. Dans une autre étude portant sur le traitement de souris greffées par des cellules de cancer mammaire murin (EMT-6) par ce même radioimmunoconjugué ( $^{213}\text{Bi}$ -201B), Kennel reporte une forte toxicité pour le parenchyme pulmonaire normal se caractérisant par l'apparition d'une fibrose pulmonaire 100 jours après le traitement, aux plus fortes activités injectées (2.6-6.7 MBq soit 70-181  $\mu$ Ci) [111].

Le développement d'un anticorps dirigé contre un antigène plus spécifique des vaisseaux tumoraux prend donc ici toute sa légitimité, en alliant efficacité et moindre toxicité.

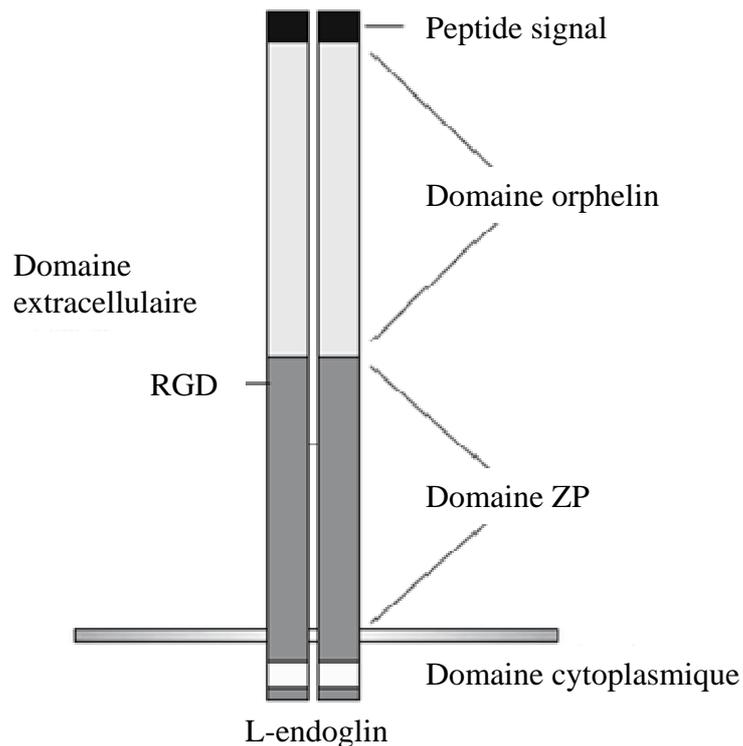


### III- Intérêts du ciblage du CD105

Contrairement à l'endothélium vasculaire bordant les vaisseaux des tissus différenciés qui est quiescent et dont le renouvellement est lent (environ 1000 jours), l'endothélium tumoral est constitué principalement de cellules endothéliales en prolifération baignant dans un environnement riche en facteurs pro-angiogéniques et en cytokines pro-inflammatoires. Dans ce contexte, les cellules endothéliales tumorales expriment ou surexpriment des marqueurs de prolifération, des marqueurs de stress hypoxique (comme HIF1 $\alpha$  (Hypoxia Inducible Factor 1  $\alpha$ )) et des récepteurs aux facteurs de croissance (comme le VEGFR) [94]. Leur taux de prolifération est 45 fois supérieur à celui de cellules endothéliales normales [93]. Cependant, un phénotype spécifique des cellules endothéliales tumorales n'a pas encore pu être défini.

#### A- Caractéristiques et expression du CD105

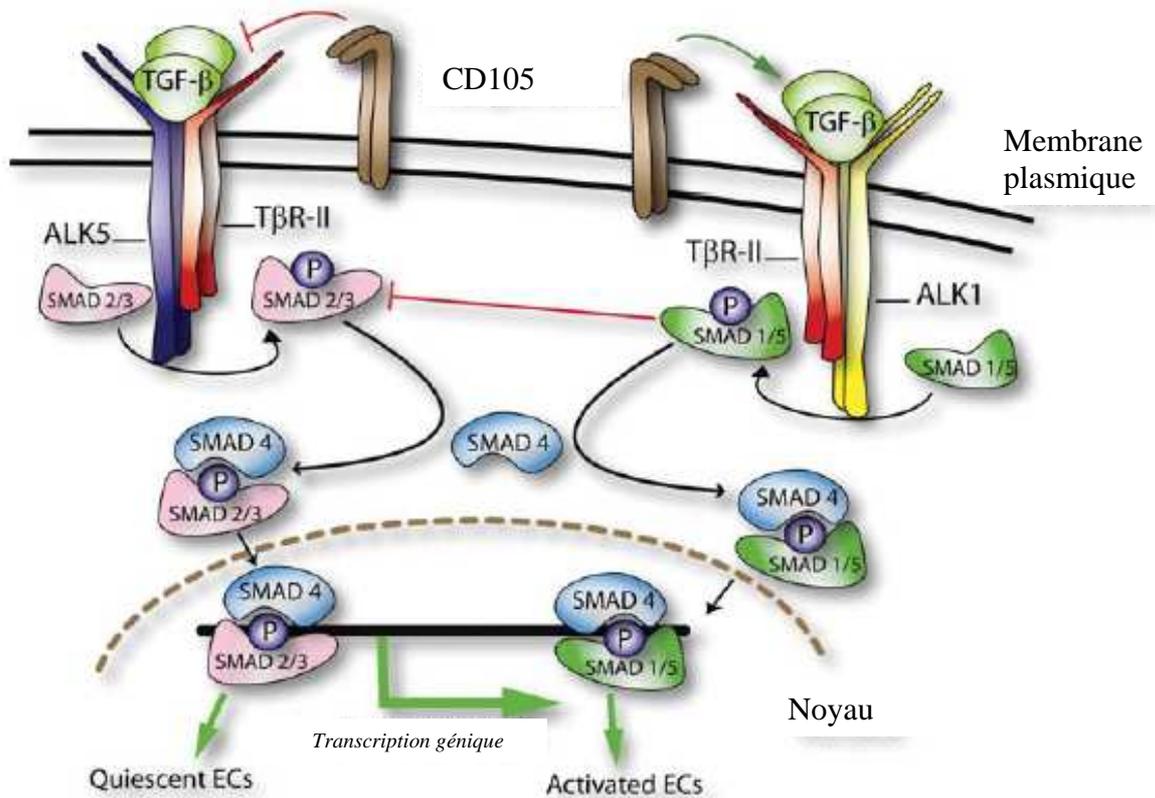
Le CD105 (appelé encore endogline) est une glycoprotéine transmembranaire de 633 acides aminés et de 180 kDa initialement identifiée comme un antigène membranaire associé aux leucémies humaines [90]. Le gène codant pour le CD105, long de 40 kb, a été localisé au niveau du chromosome humain 9q34 [73]. La transcription de ce gène produit un ARN messager (ARNm) de 3,4 kb et de 14 exons. Les exons 1 à 12 codent pour le domaine extracellulaire (561 acides aminés), l'exon 13 code pour le domaine transmembranaire (25 acides aminés) et l'exon 14 pour le domaine cytoplasmique (47 acides aminés) [47, 85]. Le CD105 est une protéine dimérique présentant un domaine extracellulaire développé, un seul domaine transmembranaire et une courte région intracellulaire (**Figure 14**). Suite à la découverte du CD105 en 1988 par l'équipe de Gougos, de nombreuses fonctions lui ont été attribuées. La majorité d'entre elles est associée à la régulation de la signalisation par le TGF $\beta$  [124]. La signalisation du TGF $\beta$  dans les cellules endothéliales gouverne surtout la prolifération, la migration et l'adhésion cellulaires [47].



**Figure 14 : Représentation schématique de la protéine CD105 de l'homme**

Le domaine extracellulaire est constitué d'un domaine orphelin et d'un domaine ZP (Zona Pellucida). Contrairement au CD105 humain, le CD105 murin ne possède pas de séquence RGD (séquence Arginine-Glycine-Acide aspartique) au niveau de son domaine extracellulaire (D'après [207]).

Le niveau d'expression du CD105 à la surface des cellules endothéliales module la réponse proliférative de ces dernières, induite par le TGF $\beta$ . Le CD105 se lie au TGF $\beta$  en s'associant au récepteur au TGF $\beta$  de type II (T $\beta$ R-II). De cette association résulte une altération de l'état de phosphorylation du T $\beta$ R-II, induisant la prolifération des cellules endothéliales par la voie TGF $\beta$ /ALK-1, par l'intermédiaire de la phosphorylation de Smad 1/5. Une deuxième voie de signalisation est possible, induisant la quiescence des cellules endothéliales par la voie TGF $\beta$ /ALK-5, par l'intermédiaire de la phosphorylation de Smad 2/3. Suite à cette activation, les Smads phosphorylés forment des complexes hétérodimériques avec le médiateur Smad4, agissant dans le noyau comme facteur de transcription régulant l'activité transcriptionnelle de gènes cibles (**Figure 15**) [74].



**Figure 15 : Rôle du CD105 dans la voie de signalisation TGF $\beta$  au sein des cellules endothéliales** (D'après [74]).

Deux isoformes du CD105 ont été identifiées chez l'homme et la souris : une forme longue et une forme tronquée de 35 acides aminés dont la partie cytoplasmique est restreinte à 14 acides aminés [85]. Chez l'homme et la souris, la forme longue du CD105 est la forme prédominante au sein des cellules endothéliales [58]. L'isoforme courte est exprimée dans le foie et le poumon et plus faiblement dans le cœur, la rate et l'épiderme. Ces données, issues de RT-PCR, ne précisent pas les types cellulaires concernés par ces expressions différentielles [166]. Le CD105 murin présente une homologie de 72% avec son équivalent humain. Les régions les plus conservées sont les domaines transmembranaire et cytoplasmique, pour lesquelles le pourcentage d'homologie atteint 95%.

## **B- Expression physiologique et pathologique du CD105**

### **1- Démonstration du rôle du CD105 dans l'homéostasie vasculaire**

Chez l'homme, la mutation du gène codant pour le CD105, entre les exons 1 et 9, est à l'origine de la télangiectasie hémorragique héréditaire de type 1 (ou syndrome d'Osler-Weber-Rendu) [138]. Cette affection autosomale dominante se caractérise par une dysplasie vasculaire multisystémique et des hémorragies récurrentes, notamment au niveau de la cavité orale et des tractus respiratoire, gastro-intestinal et urinaire [7]. Ce syndrome atteint une fréquence de 1 pour 10 000 [23]. L'importance du CD105 dans l'homéostasie vasculaire est attestée par l'étude du phénotype des souris knock-out *end*<sup>-/-</sup>. Ces souris knock-out pour le gène de CD105 meurent *in utero* précocement (à J9 de gestation) d'une insuffisance vasculaire de la vésicule vitelline et de malformations cardiaques (défauts valvulaires et défauts de septation) [58, 124]. Les souris hétérozygotes constituent un modèle pour la télangiectasie hémorragique héréditaire de type 1. Elles présentent des vaisseaux sanguins fragiles et souffrent d'épistaxis [207]. Des études *in vitro* montrent que les cellules endothéliales *end*<sup>+/-</sup> présentent des capacités migratoires et prolifératives significativement réduites, attestant du rôle prépondérant du CD105 dans la migration et la prolifération des cellules endothéliales et donc dans la vasculogénèse [104].

Lors de l'angiogénèse, l'expression du CD105 est associée à la prolifération des cellules endothéliales soumises à une angiogénèse active *in vitro* et *in vivo* [146]. Le CD105 est fortement exprimé par les cellules endothéliales en prolifération (jusqu' à  $3 \times 10^6$  copies par cellule), plus exprimé que d'autres cibles des thérapies antiangiogéniques telles que les VEGFR (moins de  $0,2 \times 10^6$  copies par cellule) [37]. Son expression promeut l'angiogénèse non seulement en activant la prolifération des cellules endothéliales mais également en activant des voies de signalisation antiapoptotiques au sein des cellules endothéliales dans des conditions d'hypoxie [47]. Cette activation passe par la liaison à des éléments HRE (Hypoxia Responsive Elements), répondant à l'hypoxie en amont du site de transcription du gène du CD105 [19].

## 2- Expression du CD105 dans les tissus humains adultes normaux et tumoraux

Le CD105 n'est que très peu présent au niveau de l'endothélium vasculaire quiescent, qui représente la majorité de l'endothélium vasculaire d'un organisme adulte. L'expression du CD105 au niveau des tissus humains normaux est détaillée **tableau VIII** [47].

**Tableau VIII : Expression du CD105 par les tissus humains normaux**

Localisation	Type cellulaire
Appareil cardiovasculaire	Cellules endothéliales
	Cellules musculaires lisses vasculaires
Système hématopoïétique	Fibroblastes du stroma
	Progéniteurs B
	Précurseurs érythroïdes
Système des phagocytes mononucléés	Macrophages interstitiels de la pulpe rouge splénique
	Monocytes activés
	Macrophages différenciés
	Cellules dendritiques folliculaires des organes lymphoïdes
Appareil génito-urinaire	Cellules interstitielles extra-glomérulaires
	Cellules mésangiales glomérulaires
	Cellules basales des tubes séminifères
Tégument	Mélanocytes
Embryon	Syncytiotrophoblastes du placenta
	Cellules mésenchymateuses cardiaques embryonnaires

Le CD105 est surexprimé par les cellules tumorales humaines dans la leucémie lymphoblastique aiguë de type non-T et dans la leucémie myéloïde monocyttaire [84]. De même, le CD105 est surexprimé par l'endothélium vasculaire tumoral dans les cancers du sein [116], du colon [182], du poumon [206], de la prostate [221], de l'estomac [155], du foie [227], du rein [226], dans le mélanome, l'ostéosarcome, l'angiosarcome et le lymphome de Hodgkin [34]. Cette surexpression est imputable à la présence d'éléments HRE en amont du site de transcription du gène du CD105 [19]. Une étude plus approfondie de Zhu montre que la surexpression du CD105 passe par la voie ERK (Extracellular signal-Related Kinase), p38 MAPK et JNK (Jun amino-terminal Kinase) [233]. Une thérapie ciblant le CD105 s'avère donc théoriquement pertinente et peu toxique au vu de la forte différence d'expression de cet antigène entre les tissus normaux et tumoraux.

### 3- Comparaison avec des marqueurs vasculaires classiques (CD31 et facteur de Von Willebrand)

Loin d'être un tissu homogène, l'endothélium vasculaire revêt différents profils phénotypiques, dépendant du type de vaisseau et du tissu auquel il appartient. Ceci n'est guère surprenant si l'on considère les différentes fonctions des cellules endothéliales dans les tissus. Pour n'en citer que quelques-unes, les cellules endothéliales sont chargées de la maintenance de la barrière hémato-encéphalique (capillaires continus), contribuent à la filtration de sang par le rein (capillaires fenêtrés) ou encore au maintien de la fonction hépatique (capillaires sinusoïdes). De nombreux anticorps dirigés contre les cellules endothéliales sont utilisés pour l'identification histopathologique des microvaisseaux tumoraux. Parmi eux, deux catégories peuvent être évoquées : les marqueurs dits « pan-endothéliaux », tels le CD31 et le facteur de Von Willebrand (vWF) et les marqueurs de l'endothélium en prolifération, tel le CD105 (**Tableau IX**).

L'anticorps anti-CD31 est un anticorps ciblant le PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule), une molécule d'adhésion présente à la surface des cellules endothéliales. Cet anticorps est utilisé comme « gold standard » pour évaluer la densité microvasculaire tumorale dans de nombreuses études. Cependant, quelques marquages non spécifiques peuvent être présents et gênants (plasmocytes, plaquettes, cellules inflammatoires) [76, 215]. Néanmoins, cet anticorps présente une valeur pronostique certaine grâce à son large spectre de réactivité, le plus large des marqueurs vasculaires endothéliaux.

Le vWF joue un rôle important dans l'adhésion et l'agrégation plaquettaires et est localisé au sein des corps de Weibel-Palade, dans le cytoplasme des cellules endothéliales. L'expression du vWF est connue pour être restreinte aux vaisseaux de gros calibres hautement différenciés (artères et veines). Son expression tend à décroître au fur et à mesure que le diamètre du vaisseau diminue [118]. Le vWF est également fortement exprimé par les plaquettes, les mégacaryocytes et les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques. La variabilité d'expression du vWF sur les cellules endothéliales est dépendante du stade de maturation du vaisseau. Les vaisseaux intratumoraux sont peu différenciés et immatures et donc, n'expriment pas ou très peu cet antigène. La valeur pronostique de ce marqueur est donc limitée.

De nombreuses études rapportent la supériorité du marquage par un anticorps anti-CD105 par rapport à un marquage par le CD31 ou le vWF, en termes de sensibilité [17, 116]. Le CD105 permet une détection spécifique des vaisseaux tumoraux car il est fortement surexprimé par ces derniers. Il constitue donc également, au travers de la mesure de la densité microvasculaire intratumorale, un meilleur indicateur pronostique [19].

**Tableau IX : Caractéristiques et propriétés des marqueurs classiques de l'angiogénèse (CD31, vWF) comparées au CD105**

	CD31	Facteur de Von Willebrand	CD105
Expression cellulaire	Cellules endothéliales Plaquettes Monocytes Neutrophiles Plasmocytes	Cellules endothéliales Mégacaryocytes Plaquettes	Cellules endothéliales en prolifération Proérythroblastes Monocytes activés Trophoblastes
Vaisseaux de gros diamètre (artère, veine)	+++	+++	+
Vaisseaux de petit diamètre (capillaire)	++	-	+++
Vaisseaux lymphatiques	-	++	+

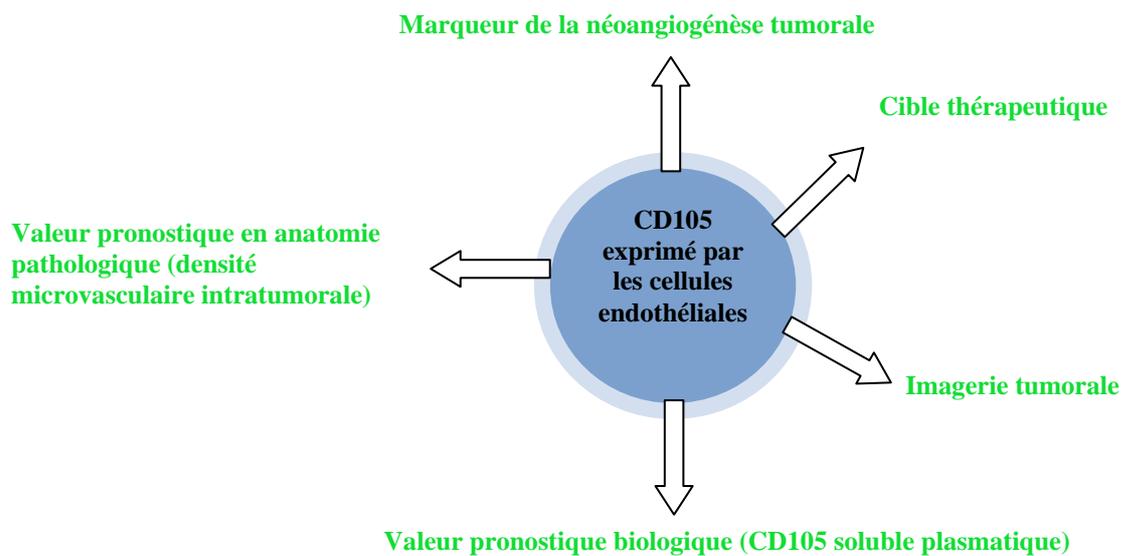
En conclusion, les arguments pour lesquels le CD105 est une cible potentielle intéressante sont nombreux [213] :

- l'expression du CD105 est relativement faible au niveau des tissus normaux par rapport aux tissus tumoraux,
- cet antigène est associé à la prolifération des cellules endothéliales et est surexprimé par l'endothélium tumoral.

De plus, le ciblage du CD105 et la destruction des cellules endothéliales qui en résulte, contribuent à renforcer l'hypoxie au sein de l'environnement tumoral. Cette hypoxie, dans un processus de cercle vertueux, induit la surexpression de CD105 sur les cellules endothéliales survivantes (par l'intermédiaire des HRE). Le CD105 serait donc potentiellement surexprimé suite à une thérapie dont il est la cible, amplifiant ainsi ses effets antitumoraux.

## C- Application des anticorps anti-CD105 en cancérologie

En tant que marqueur des cellules endothéliales en prolifération, le CD105 présente un intérêt diagnostique (imagerie tumorale et examen histopathologique), pronostique (évaluation de la densité microvasculaire intratumorale, quantification de sa forme soluble dans le plasma) et thérapeutique (anticorps anti-CD105) (**Figure 16**) [19].



**Figure 16 : Intérêts du CD105 en cancérologie**  
(D'après [19]).

### 1- Anticorps anti-CD105 et pronostic

De nombreuses études rétrospectives ont évalué la pertinence du marquage immunohistochimique avec un anticorps anti-CD105. Ces études ont démontré que le CD105 est surexprimé au niveau des cellules endothéliales tumorales de nombreux carcinomes : sein [116], prostate [221], estomac [155], foie [227], poumon [206], colon [182], rein [226], utérus [234], sphère oro-pharyngée [132] et d'autres cancers non carcinomateux comme l'astrocytome [229]. Parmi ces tumeurs, la densité vasculaire évaluée par immunohistochimie anti-CD105 est étroitement corrélée avec un pronostic péjoratif. Une étude d'Akagi montre une augmentation de la densité microvasculaire, étudiée par un immunomarquage anti-CD105, lors de la progression dysplasie-adénome-carcinome colique. Dans ce cadre, la détermination de l'expression du CD105 prend un caractère prédictif

du risque de progression de lésions dysplasiques du colon vers un cancer colique [2].

L'expression du CD105 est également corrélée au risque de métastases dans le carcinome prostatique [221], le carcinome gastrique [155], le carcinome du col de l'utérus [234] et le carcinome mammaire [46]. Le CD105 est exprimé à la fois par l'endothélium vasculaire en prolifération mais également par l'endothélium lymphatique. Une thérapie ciblée sur le CD105 pourrait donc avoir un effet sur les deux modes les plus fréquents de dissémination métastatique, la voie sanguine et la voie lymphatique [29].

L'évaluation de la densité microvasculaire à l'aide d'anticorps anti-CD105 est corrélée à la diminution du taux de survie dans le mélanome [134], le carcinome mammaire [116], le carcinome endométrial [64], le cancer non à petites cellules du poumon [206], le carcinome de la prostate [221], le carcinome gastrique [155], le carcinome épidermoïde lingual [40], le carcinome rénal à cellules claires [57] et le glioblastome [17].

Enfin, le taux sérique de CD105 soluble est significativement plus élevé chez les patients présentant des carcinomes métastatiques (notamment du sein [204], de la prostate [107], du foie [227] et du colon [122]) ou des tumeurs hématologiques dont le myélome multiple [211] par rapport aux individus sains ou aux patients sans métastase. La détection du taux sérique de CD105 soluble peut donc présenter une valeur pronostique.

## 2- Anticorps anti-CD105 et imagerie

Le CD105 est un antigène présent au niveau de la membrane des cellules endothéliales en prolifération. Il est donc facilement accessible à des anticorps anti-CD105 et permet une imagerie rapide. De nombreuses études ont utilisé des anticorps anti-CD105 (humain ou murin) couplés à différents radionucléides (indium 111 ( $^{111}\text{In}$ ),  $^{125}\text{I}$ , technetium 99 ( $^{99}\text{Tc}$ ), gallium 66 ( $^{66}\text{Ga}$ ), cuivre 64 ( $^{64}\text{Cu}$ ) ou encore zirconium ( $^{89}\text{Zr}$ )) et chez différentes espèces (souris, chien et homme). Les caractéristiques des différents anticorps anti-CD105 actuellement disponibles sont décrites dans le **tableau X**.

**Tableau X : Méthodes d'obtention des différents anticorps anti-CD105**

Anticorps	Type d'immunisation	Cible
SN6	Immunisation de souris avec des membranes cellulaires de cellules de leucémie humaine [90]	CD105 humain
44G4	Immunisation de souris avec des suspensions de cellules entières de leucémie humaine [84]	CD105 humain
TC-11	Immunisation de souris avec des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine [34]	CD105 humain
MJ7/18	Immunisation de rats avec de la peau inflammatoire de souris [77]	CD105 murin

Leurs applications en imagerie sont détaillées dans le **tableau XI**.

**Tableau XI : Principaux anticorps anti-CD105 utilisés en imagerie**

	MJ7/18	MA-END3	E9	TRC-105
<b>Type d'anticorps</b>	Anti-CD105 de rat antisouris (IgG2a $\kappa$ )	Anti-CD105 de souris antihumain (IgG1)	Anti-CD105 de souris antihumain (IgG1)	Anti-CD105 chimérique humain/murin (IgG1)
<b>Radionucléide</b>	<sup>111</sup> In	<sup>125</sup> I	<sup>99</sup> Tc	<sup>66</sup> Ga, <sup>64</sup> Cu, <sup>89</sup> Zr
<b>Détection</b>	Scintigraphie	Scintigraphie	SPECT	PET
<b>Tumeurs étudiées</b>	B16 (mélanome murin)	Adénocarcinome mammaire	Carcinome rénal	4T1 (carcinome mammaire murin) MCF7 (carcinome mammaire humain)
<b>Espèce</b>	Souris	Chien	Homme	Souris
<b>Références</b>	[28]	[72]	[43]	[63, 95, 96]

L'étude de Bredow, utilisant le MJ7/18 couplé à l'<sup>111</sup>In, détaille la pharmacocinétique de cet anticorps et montre que 97% de la dose injectée de MJ7/18 quitte le volume sanguin circulant en 15 minutes et que la demi-vie sanguine est inférieure à 1 minute, ce qui démontre une fixation rapide de cet anticorps. Une liaison de cet anticorps au niveau du foie, du rein et du cœur est également observée dans cette étude [28].

### 3- Anticorps CD105 et thérapie anticancéreuse

Les différentes études utilisant des anticorps anti-CD105 à visée thérapeutique chez la souris sont répertoriées dans le **tableau XII**.

Tableau XII : Études utilisant des anti-CD105 à visée thérapeutique

Anti-CD105	Couplage	Modèle	Espèce	Effet	Référence
SN6a, SN6j, SN6k	Nu	4T1 (carcinome mammaire murin) Colon-26 (carcinome colique murin)	Souris	Augmentation de la survie Inhibition de la croissance tumorale Suppression de la formation de métastases Absence d'effet secondaire	[212, 213]
MJ7/18	Nu	WiDr (cancer colique humain)	Souris	Diminution de la taille de la tumeur Diminution du nombre des métastases pulmonaires	[147]
SN6f, SN6j	Ricine	MCF7 (cancer du sein humain)	Souris SCID xénotreffées	Diminution de la croissance tumorale Suppression des métastases	[136, 189]
SN6f, SN6j	<sup>125</sup> I	MCF7 (cancer du sein humain)	Souris SCID xénotreffées	Inhibition de la croissance tumorale	[201]
SN6h	Nu	MCF7 (cancer du sein humain)	Chimère peau humaine/souris SCID	Diminution de la croissance tumorale	[203]
TEC-11	Ricine	HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell)	<i>In vitro</i>	Diminution de la prolifération des cellules endothéliales	[34]
MJ7/18	Nigrine b	B16MEL4A5 (mélanome murin)	Souris C57BL/6J	Blocage de la croissance tumorale	[151]

Ces anticorps ont été utilisés soit nus, soit couplés à une immunotoxine (ricine ou nigrine-b), soit couplés à un radionucléide ( $^{125}\text{I}$ ). Les résultats obtenus sont assez prometteurs, faisant état :

- d'une augmentation de l'apoptose,
- d'une inhibition de l'angiogénèse,
- d'une diminution de la prolifération des cellules endothéliales,
- d'une diminution, voire d'une inhibition de la croissance tumorale,
- d'une diminution, voire d'une suppression des métastases.

#### 4- Mécanismes d'action des anticorps anti-CD105

Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de l'activité antivasculaire des anticorps anti-CD105 [19, 190].

Premièrement, la liaison de l'anticorps au CD105 membranaire des cellules endothéliales en prolifération peut bloquer la fonction du CD105, modifier la cascade de signalisation en aval, supprimant ainsi la multiplication des cellules endothéliales, voire provoquant leur mort. Il est important de noter que les cellules dépourvues de CD105 subissent une apoptose en présence de TGF $\beta$  et en conditions hypoxiques [123].

Un second mécanisme peut impliquer des interactions entre le fragment Fc de l'anticorps lié au CD105 membranaire et le récepteur Fc des cellules immunitaires effectrices, aboutissant à une ADCC (Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity).

Une troisième possibilité est une CDC (Cytotoxicité Dépendante du Complément) conduisant à la lyse de la cellule cible. En ce qui concerne la CDC, une étape préalable nécessite le recrutement du composant C1q par les IgG liées à la cellule cible. Cette étape déclenche une cascade protéolytique aboutissant à l'activation du complément. Cela conduit à la formation du complexe d'attaque membranaire lysant la cellule cible en détruisant sa membrane plasmique. De plus, le C1q lié à la cellule cible peut interagir avec les récepteurs du complément C1qR, CR1(CD35) et CR3 (CD11b/CD18) présents sur les cellules effectrices (granulocytes neutrophiles, macrophages et cellules NK). Ces deux mécanismes aboutissent à la lyse ou la phagocytose de la cellule cible, suivant la nature de la cellule immunitaire engagée (**Figure 17**).

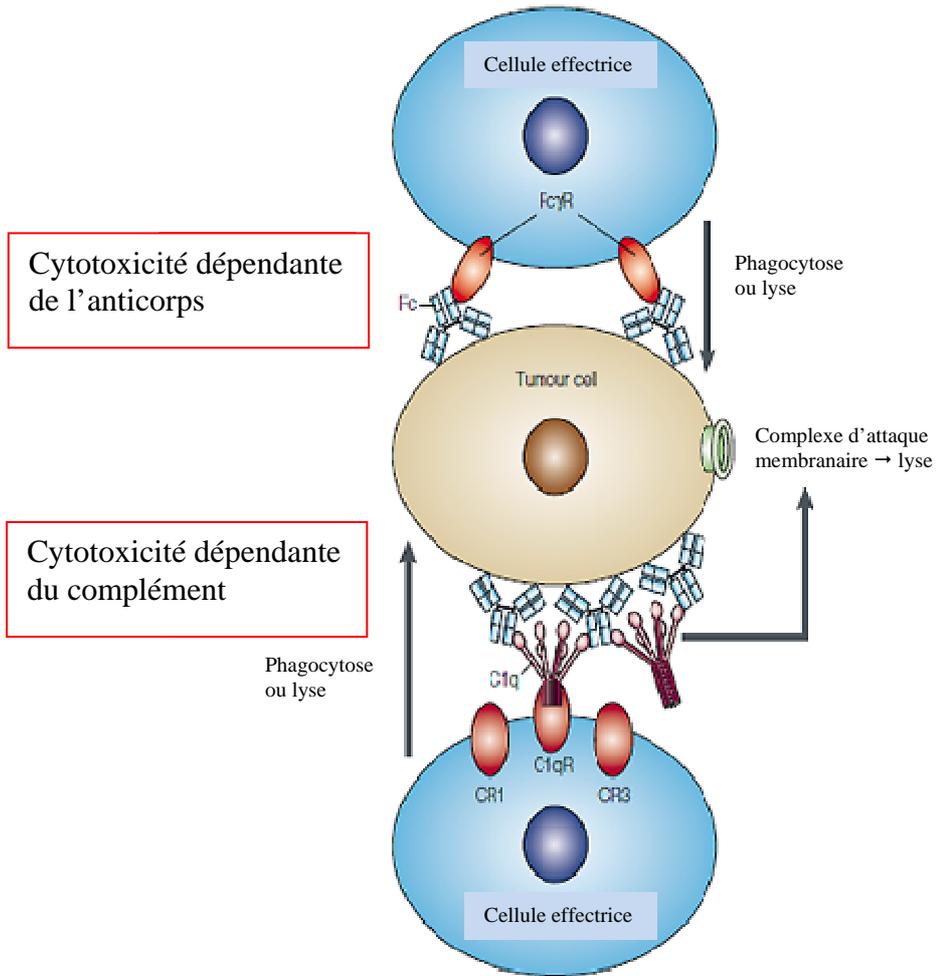


Figure 17 : Mécanismes d'action des anticorps anti-CD105 : ADCC et CDC



## **IV- Expression du CD105 et intérêt du ciblage endothélial par la radioimmunothérapie alpha dans un modèle murin de cancer du sein**

### **A- Objectifs de travail**

Les expérimentations *in vivo* constituent une étape importante dans le développement préclinique de thérapies antiangiogéniques, notamment pour établir la preuve de concept de nouvelles cibles moléculaires et pour évaluer la pharmacocinétique et la toxicité. De nombreuses thérapies antiangiogéniques sont évaluées chez des souris immunodéficientes xénotreffées. La limite de ces modèles est que la vascularisation tumorale est d'origine murine ; or, les anticorps monoclonaux développés pour la médecine humaine ne présentent que rarement des réactions croisées avec les tissus murins, c'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser des anticorps monoclonaux dirigés contre l'antigène murin dans les études impliquant des souris, pour mieux valider l'intérêt du ciblage sélectionné.

Il nous a donc paru judicieux de produire et de purifier un anticorps anti-CD105 murin (le MJ7/18), disponible à l'ATCC (American Type Culture Collection) afin de pouvoir mener à bien les études portant sur l'effet des anticorps anti-CD105 sur modèles murins.

## **B- Article 2**

### **CD105 expression and usefulness of its targeting for antivasular alpha radioimmunotherapy in a mouse model of breast cancer**

Laëtitia Dorso<sup>1,2</sup>, Jérôme Abadie<sup>2</sup>, Frank Bruchertseifer<sup>3</sup>, Alfred Morgenstern<sup>3</sup>, Mickaël Bourgeois<sup>1,4</sup>, Catherine Sai-Maurel<sup>1</sup>, Michel Chérel<sup>1</sup>, François Davodeau<sup>1</sup>

1- Nantes-Angers Cancer Research Center CRCNA, University of Nantes, INSERM UMR892, CNRS UMR6299, Nantes, France

2- LUNAM University, Oniris, AMaROC Unit, Nantes, F-44307, France

3- European Commission, Joint Research Centre, Institute for Transuranium Elements, Karlsruhe, Germany

4- Nuclear Medicine Department, University Hospital, Nantes, France

Corresponding author:

François Davodeau, Inserm U892, CNRS UMR 6299, CRCNA, IRS-UN, 8 quai Moncoussu, BP 70721, 44007 Nantes Cedex 01

E-mail: françois.davodeau@univ-nantes.fr

## Abstract

CD105 expression is considered to be a specific marker of neoangiogenesis. In tumors, its overexpression is correlated with a poor prognosis. Radioimmunotherapy (RIT) uses radiolabelled specific antibodies to selectively irradiate the tumor. Alpha particles are characterized by high energy and short path length and are particularly suitable for vascular targeting. In order to test the potential usefulness of CD105 as a target for alpha RIT, we evaluated a) the expression and location of CD105 in normal and grafted tumoral murine tissues (murine colon cancer, murine multiple myeloma and xenografted human breast cancer), in comparison to other common endothelial markers; b) the biodistribution of an antibody raised against murine CD105 (MJ7/18) after intravascular injection in xenografted mice; c) the effectiveness of a targeted radioimmunotherapy (RIT) against CD105, using the MJ7/18 antibody coupled with  $^{213}\text{Bi}$  and  $^{211}\text{At}$  in mice bearing MDAMB468 triple-negative breast tumor.

Immunohistochemistry studies showed that, in normal tissues, CD31 was expressed on arteries, veins and capillaries; vWF was detected on large vessels but not in capillaries and CD105 was strongly expressed on capillaries, but weakly on large vessels. In tumoral tissues, CD31 was expressed on all vascular structures, in peritumoral or intratumoral areas; vWF was expressed on peripheral large vessels but not in intratumoral capillaries. CD105 was strongly expressed on intratumoral capillaries and weakly on peripheral arteries making this a good candidate for vascular targeting in tumors. Biodistribution study showed an early accumulation of MJ7/18 in lungs, liver, heart, spleen, and kidney, in agreement with the results of the immunohistochemical study. In the tumor, there was an accumulation of MJ7/18 beyond 48h, and there was no activity decrease with time, unlike other organs, in favor of antibody fixation and accumulation on tumor vasculature. Alpha RIT with  $^{213}\text{Bi}$ -MJ7/18 and  $^{211}\text{At}$ -MJ7/18 showed a delayed tumoral growth attesting the relevance of the CD105 as a target in anticancer therapies.

**Keywords:** mouse, CD105, angiogenesis, immunohistochemistry, radioimmunotherapy, breast cancer.

Angiogenesis plays a central role in the pathogenesis of cancer. It is critical for maintaining the oxygen and nutrients supply and the removal of waste products to support tumor growth beyond a few mm<sup>3</sup> <sup>(11)</sup>. The concept of vascular targeting was originally proposed by Folkman and has been subsequently extended by numerous investigators as an alternative adjuvant to traditional anticancer therapies <sup>(27)</sup>. The benefits of this approach are numerous. First, targeting endothelial cells may be efficiently performed after intravenous administration of the antivascular agent. Second, each intratumoral capillary supports thousands of tumor cells, so the death of several endothelial cells could lead to the death of thousands tumoral cells. Third, mutant and resistant tumor endothelial cells are unlikely to emerge as a result of vascular targeting because the tumoral endothelium is non-malignant and has a relatively stable genome. Fourth, this non-selective approach should be applicable to a broad spectrum of tumors.

CD105 (endoglin) is an endothelial cell surface molecule of particular interest for vascular targeting. This 180 kDa cell surface protein is expressed as a homodimer with disulphide bonds on endothelial cells. The main evidence supporting the fundamental role of CD105 in angiogenesis is observed in CD105 knockout mice showing defective vascular development leading to death during early gestation <sup>(18)</sup>. In human, mutations in the CD105 gene are associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 (HHT-1), a dominant-inherited disease, characterized by arteriovenous malformations and bleeding <sup>(21)</sup>.

Endoglin has been found to be an auxiliary receptor for the TGF- $\beta$  receptor complex. In particular, it antagonizes the inhibitory effects of TGF- $\beta$ 1 on endothelial cells, i.e. the suppression of growth, migration and capillary tube formation <sup>(12)</sup>. In human, CD105 expression is not restricted to endothelial cells. It is also expressed on activated monocytes, differentiated macrophages, early B cells, erythroid precursor cells, follicular dendritic cells, vascular smooth muscle cells and trophoblastic cells <sup>(8)</sup>. However, it has been demonstrated that CD105 is overexpressed in endothelial cells during tumor angiogenesis in many solid tumors. Expression of CD105 is indeed correlated with vascular density, poor prognosis, decreased survival rate and metastasis risk in many cancers: breast <sup>(16)</sup>, colon <sup>(24)</sup>, lung <sup>(26)</sup>, prostate <sup>(29)</sup>, stomach <sup>(22)</sup>, liver <sup>(31)</sup>, endometrium <sup>(10)</sup>, kidney <sup>(30)</sup> and brain <sup>(25)</sup>. These properties make CD105 an attractive target for therapeutic interventions.

Animal studies represent important steps in preclinical development of antiangiogenic therapies, particularly to determine the proof of concept of new approaches or target, to evaluate toxicity and pharmacokinetics, and to determine the biodistribution of the therapeutic compound at the level of a whole organism. Regarding this kind of studies, numerous

anticancer therapies are tested on immunodeficient mice which are xenografted with human cell lines. One limitation of these models is that the tumor vasculature originates from host's tissues, i.e. murine tissues. Thus, because therapeutic monoclonal antibodies developed for human medicine do not always cross-react with animal tissues, experiments in murine models has to be performed using a monoclonal antibody directed against murine antigen if interesting translational data are expected<sup>(19)</sup>. In mice, CD105-specific antibodies, either alone or conjugated with different effector molecules, react only weakly or not at all with quiescent endothelium but specifically bind to proliferating endothelial cells during tumor angiogenesis with few signs of toxicity<sup>(20)</sup>, further emphasizing its potential for preclinical investigation in anticancer therapy.

Radioimmunotherapy (RIT) may be an interesting approach for antiangiogenic targeting because endothelial cells are easy to reach via the bloodstream by radiolabelled specific antibodies. RIT is a kind of internal radiotherapy using a vector, labeled with a radioactive isotope. The radiolabelling of the vector enables to perform a specific *in situ* irradiation, with low irradiation of surrounding healthy tissues. Several radioactive isotopes can be used, emitting different type of radioactive particles: alpha, beta or gamma. Alpha-particle emitters offer several advantages which make feasible a vascular targeting. First, alpha particles are characterized by high energy, with an average energy imparted per unit path length (LET for lineic energy transfer) of 60-230 keV/ $\mu$ m, and a short path length of 50-80  $\mu$ m, that increases the lethal effect on target cells and reduces the non-specific irradiation of normal tissue around the target cell. For comparison, beta particles have low LET (0.1 to 1 keV/ $\mu$ m) and a long path length (> 1 mm)<sup>(1)</sup>. Second, endothelial cells in tumor stroma have a limited ability to repair the damage caused by highly cytotoxic alpha particle to DNA, as double-strand breaks. At last, these biological effects have been shown to be independent of both oxygenation status and cell cycle position of the irradiated cells, enhancing the attractiveness of alpha particles for targeted radiotherapy of endothelial cells.

In this study, we proposed first to evaluate, by immunohistochemistry, the expression and location of CD105 in normal and tumoral murine tissues, in comparison to other common endothelial markers. Tumoral tissues consisted on grafted tumoral cell lines of murine origin (MC38 (colon cancer cell line) and 5T33 (multiple myeloma cell line)) or of human origin (MDAMB468 (breast cancer cell line)). Then, we evaluated the biodistribution of an antibody raised against murine CD105 (MJ7/18) after intravascular injection of <sup>125</sup>I-anti-CD105 (MJ7/18) in mice, which were xenografted with MDAMB468, a human breast cancer triple-negative cell line (ER-, PR- and HER 2-). Finally, we tested the effectiveness of a targeted

RIT against CD105, using the MJ7/18 antibody coupled with  $^{213}\text{Bi}$  and  $^{211}\text{At}$  in mice bearing MDAMB468 tumor.

## **Materiel and methods**

### Cell culture

The 5T33 murine myeloma cell line, derived from C57BL/KaLwRij mice, was kindly provided by Dr J. Radl (TNO Institute, Rijswijk, The Netherlands). The MC38 murine colon carcinoma cell line, derived from C57BL/6 mice, was provided by Dr Pélegrin (Centre de Recherche en Cancérologie, CRLLC Val d'Aurelle-Paul Lamarque, Montpellier, France). The MDAMB468 human breast carcinoma cell line was supplied by American Type Culture Collection (ATCC reference HB-132). Cell lines were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (PAA Laboratories/GE Healthcare Europe GmbH), 100 units/ml penicillin, 50  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin and 2 mM L-glutamine (GIBCO-Life technologies, Saint-Aubin, France). Cells were incubated at 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ , and 95% humidity and medium was changed every 2 to 4 days. All cell populations were observed at regular interval using an inverted microscope (Leica DM IL) and were monitored for viability with eosin dye exclusion.

### Animals

Female C57BL/6 mice and NMRI-*nu/nu* mice, weighting between 25 and 30 g and being 8 to 10 weeks old, were purchased from Janvier® (Le Genest St Isle, France). Female C57BL/KaLwRij mice weighting between 25 and 30 g and 8 to 10 weeks old, were purchased from Harlan® (Gannat, France). Mice were housed under standard conditions. All animal experiments were carried in our laboratory animal facilities (approval number B-44-279). Experiments performed in this study were approved by Ethics Committee for animal experiments - Région Pays de la Loire (N°CEEA 2012 171 for biodistribution study, N°CEEA 2013 2 for RIT experiments).

### Antibodies

The anti-murine CD105 antibody MJ7/18 was obtained by hybridoma culture (ATCC). Cells were cultured with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, 50  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin and 2 mM L-glutamine. Fetal bovine serum was previously deprived of IgG by an affinity column (HiTrap protein G GE Healthcare, Dutscher, Brumath, France).

The supernatant was harvested after one week of incubation and purified with a protein G column. Endotoxins were removed using an affinity column (Pierce High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns, Perbio Science France, Brebières, France). The purity of the antibody was controlled by SDS-PAGE. B-B4 antibody (anti-human CD138) was provided by Diaclone research (Besançon, France) and OKT3 (anti-human CD3  $\gamma$ -chain) was obtained by hybridoma culture (ATCC CRL-8001) and purified as described previously.

### Tumoral graft models

Three different cell lines (MC38, 5T33 and MDAMB468) were subcutaneously injected in the right flank. MC38 (murine colon carcinoma cell line) was used as a syngeneic epithelial tumor model, 5T33 (murine myeloma cell line) was used as a syngeneic hematological tumor model and MDAMB468 (human cancer cell line) was used as a xenografted tumor model.

Three C57BL/6 mice were injected with 200,000 MC38 cells suspended in a total volume of 100  $\mu$ L sterile phosphate-buffered saline (PBS) per mouse. Mice were sacrificed by cervical dislocation at day 35 and subcutaneous tumors were sampled. Three C57BL/KaLwRij mice were injected with  $10^6$  5T33 cells suspended in a total volume of 100  $\mu$ L sterile PBS per mouse. Mice were sacrificed by cervical dislocation at day 24 and subcutaneous tumors were sampled. Three Nude mice were injected with  $5 \cdot 10^6$  MDAMB468 cells suspended in a total volume of 200  $\mu$ L sterile PBS per mouse. Mice were sacrificed by cervical dislocation at day 30 and subcutaneous tumors were sampled.

### Histology and immunohistochemistry

Tissues samples were fixed in neutral-buffered 4% formalin, embedded in paraffin and routinely processed for histological examination. Three microns thick sections of tumor were submitted for staining with hematoxylin-eosin-saffron (HES).

Streptavidin-biotin complex immunodetection was performed using the Ventana iView Open secondary DAB (3-3'-diaminobenzidine) Detection System. Primary antibodies targeted CD31 (PECAM-1) (1/10, clone RM0032-1D12, Santa Cruz), von Willebrand Factor (or vWF) (1/400, polyclonal, Dako) and CD105 (1/15, clone MJ7/18, ATCC). Secondary antibodies were biotinylated goat anti-rat IgG (1/100, polyclonal, Invitrogen) for CD31 and CD105, and biotinylated goat anti-rabbit IgG (1/200, polyclonal, Dako) for vWF. Sections were counterstained with hematoxylin. Immunohistochemical stains were performed with an automated slide preparation system (Benchmark XT, Ventana, Roche Diagnostics France, Meylan, France).

### Radiolabelling of antibodies with $^{213}\text{Bi}$ and $^{211}\text{At}$

$^{213}\text{Bi}$  decays mainly (98%) by beta- and 440 keV gamma emissions with a  $t_{1/2}$  of 45.6 min to the ultra-short lived high energy (8.4 MeV) alpha emitter  $^{213}\text{Po}$  ( $t_{1/2} = 4.2 \mu\text{s}$ ), whereas a direct  $\alpha$  decay pathway to  $^{209}\text{Tl}$  plays only a negligible role (2% of all  $^{213}\text{Bi}$  decays) <sup>(3)</sup>. Antibodies (CD105, OKT3 and B-B4) were modified with 2-(4-isothiocyanatobenzyl)-cyclohexyl-diethylenetriaminepenta-acetic acid (SCN-CHX-A''-DTPA, Macrocyclics) as previously described <sup>(23)</sup>. In brief, antibodies were incubated with 20 equivalents (mol/mol) of CHX-A''-DTPA in carbonate buffer (0.05 M, pH 8.7) and, after overnight incubation at room temperature, purified by high-performance liquid chromatography on a Sephadex G200 gel-filtration column (Amersham Biosciences). For labeling with  $^{213}\text{Bi}$ , the antibodies were incubated with  $^{213}\text{Bi}$  eluted from a  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$  generator (Institute for Transuranium Elements) for 10 min in 0.8 M ammonium acetate pH 5.3. The resulting  $^{213}\text{Bi}$ -labelled antibodies were separated from unbound  $^{213}\text{Bi}$  by size-exclusion chromatography using a PD-10 column (GE Healthcare) <sup>(2)</sup>. Radiochemical purity was greater than 95%, as determined by instant thin-layer chromatography silica gel (ITLC-SG) using 10% trichloroacetic acid as the solvent <sup>(7)</sup>. The radiolabelling of  $^{211}\text{At}$ -MJ7/18 was performed according the method described by Bourgeois et al. <sup>(6)</sup>.

### Biodistribution study and dosimetry

We performed biodistribution study with  $^{125}\text{I}$ -MJ7/18 and applied the decay of  $^{213}\text{Bi}$  to the results obtained with  $^{125}\text{I}$ . Indeed, the short half-life of  $^{213}\text{Bi}$  is not convenient for biodistribution and Hartmann et al. previously shown that biodistribution of  $^{205/206}\text{Bi}$ -radiolabeled antibodies and  $^{125}\text{I}$ -radiolabeled antibodies were comparable over time up to 24h <sup>(14)</sup>. Groups of three mice, xenografted with  $5.10^6$  MDAMB468 cells 30 days earlier, were injected with  $^{125}\text{I}$ -MJ7/18 (8  $\mu\text{g}$ ) via the tail vein and were sacrificed by cervical dislocation at 4, 24, 48 and 72 h after the injection. Mice were subjected to a full necropsy and blood, liver, kidney, lung, spleen and heart were sampled. The amount of radionuclide activity in tissues was measured by gamma scintillation counter (Wallac, Billeria, MA) in parallel with a calibrated standard. The results were expressed as the mean percentage of injected dose per gram of tissue (%ID/g)  $\pm$  standard deviation (SD) and corrected by the application of the decay of  $^{213}\text{Bi}$ .

### Radioimmunotherapy with $^{213}\text{Bi}$

Thirty-three nude mice were subcutaneously xenografted with  $5.10^6$  MDAMB468 cells, expressing CD138 antigen at the surface of their cytoplasm. Mice were divided in 3 groups: OKT3 (non specific antibody) (n=8), BB-4 (anti-CD138 antibody) (n=9) and MJ7/18 (anti-CD105 antibody) (n=9). Seven mice were used as control for the three groups. Antibodies were injected with a single dose injection, 24 days after engraftment when tumoral volume reached  $200 \text{ mm}^3$ . Mice received increasing activity of antibodies coupled with  $^{213}\text{Bi}$  (3.7 MBq (n=4 for OKT3 and B-B4, n=5 for MJ7/18) and 11.1MBq (n=4 for OKT3 and MJ7/18, n=5 for B-B4)). Tumoral volume was regularly recorded with a caliper and expressed as relative volume compared to initial volume at day 0 (day of radioimmunoconjugate injection).

### Fractionated radioimmunotherapy with $^{211}\text{At}$

Seven nude mice were subcutaneously xenografted with  $5.10^6$  MDAMB468 cells. Mice were divided in 2 groups: control mice (n=4) and mice receiving  $^{211}\text{At}$ -MJ7/18 (n=3). The antibody was injected intravenously twice, 24 days (0.37 MBq) and 90 days (0.67 MBq) after engraftment.

### Statistical analysis

Tumoral growth curves were compared with the 2-sided Mann-Whitney test. P values of 0.05 or less were considered significant. These analyses were performed using Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

## **Results**

### Immunohistochemical expression of CD105 on normal murine tissues and comparison to other endothelial markers

CD105 expression was evaluated in many organs, among which: heart, kidney, liver, spleen, lung, skin, bone marrow, thymus, lymph node, brain, eye, tongue, esophagus, stomach, small intestine, caecum, colon, pancreas, salivary gland, adrenal gland and uterus (data not shown). In normal tissues, expression of CD105 was detected only on endothelial cells of blood-vascular structures and not on other type of cells (epithelial cells, mesenchymatous cells). No or very slight and inconstant staining for CD105 was observed in arterial and venous vessels. Some capillaries were positive for CD105 (glomerular and interstitial kidney capillaries, uterine capillaries, fenestrated capillaries of adrenals and sinusoidal capillaries of bone

marrow and liver). Alveolar septal capillaries of the lung were moderately positive. Some capillaries were positive for CD105 expression in the endometrium, one of the adult organs in which neoangiogenesis takes place physiologically (**Table 1 and Figure 1**).

In normal tissues, positive staining for CD31 was observed on endothelial cells of large arteries and veins, arterioles, venules and capillaries of nearly all evaluated organs. Of note, endothelial cells of spleen sinus, red pulp capillaries, central arteries of the spleen, cutaneous lymphatic vessels and chyliferous vessels of the intestine were negative for CD31. Moreover, platelets, monocytes, neutrophils and plasma cells were positively stained by CD31 (**Table 1 and Figure 1**).

In normal tissues, vWF was expressed on endothelial cells of large arteries and veins, of arterioles and venules but not in small capillaries. Glomerular capillaries of the kidney, alveolar septal capillaries of the lung, fenestrated capillaries of adrenals and sinusoidal capillaries of bone marrow and liver were negative. Moreover platelets and megakaryocytes showed a positive staining for vWF (**Table 1 and Figure 1**).

In normal tissues, CD105 immunohistochemistry stained endothelial cells of some capillaries and weakly other vascular structures (arteries and veins). Moreover, CD105 was specific to endothelial cell, unlike CD31 and vWF. Therefore, antibody against CD105 can be used in therapy, with less probability of fixation in normal tissues and organs than antibody against CD31 or vWF.

#### Immunohistochemical expression of CD105 on tumoral grafts and comparison to other endothelial markers

Mice were grafted (MC38 and 5T33) or xenografted (MDAMB468) with several cancer cell lines. MC38 is a murine colon cancer cell line, 5T33 is a murine myeloma cell line and MDAMB468 is a human breast cancer cell line. We thus disposed of a syngeneic epithelial tumor, a syngeneic hematopoietic tumor and a xenogeneic epithelial tumor.

Immunohistochemical experiments showed that, in peritumoral areas, CD105 was strongly expressed by veins but weakly by arteries. In intratumoral areas, tumoral vessels (mostly capillaries) strongly expressed CD105 for every injected cell line (MC38, 5T33 and MDAMB468). CD31 was strongly expressed by all vessels, in peritumoral and intratumoral areas, for every injected cell line. Whatever the cell line, reactivity of vWF was quite similar in peritumoral areas where vWF was strongly expressed by arteries and veins while in intratumoral areas tumoral vessels did not express vWF (**Table 2 and Figures 2, 3 and 4**).

As far as CD105 was concerned, there was a striking differential expression between healthy vessels and intratumoral tumoral vessels, attesting by the strong expression of CD105 by tumoral capillaries. CD105 should appear as a relevant target for cancer therapies, with little effect on normal vascular structure.

#### Biodistribution study

Biodistribution study was performed with a monoclonal antibody anti-murine CD105 (MJ7/18), coupled with  $^{125}\text{I}$ . The radioimmunoconjugate was injected in the caudal vein of mice, which were xenografted with MDAMB468, 30 days before.

The activity in the lung was higher at 4h (17.50% ID/g ( $\pm$  4.73)) but rapidly decreased to less than 4.01% ID/g ( $\pm$  0.36) at 24h after injection. The activity in the blood was lower at 4h (9.11% ID/g ( $\pm$  0.64)) and decreased slowly to 5.49% ID/g ( $\pm$  0.19) at 24h after injection. In the liver, heart, spleen and kidney, the activity decreased from 6.72% ID/g ( $\pm$  0.68), 4.66% ID/g ( $\pm$  0.68), 4.59% ID/g ( $\pm$  1.04) and 3.93% ID/g ( $\pm$  0.43) respectively at 4h to 3.05% ID/g ( $\pm$  0.41), 2.47% ID/g ( $\pm$  0.5), 2.67% ID/g ( $\pm$  0.21) and 2.69% ID/g ( $\pm$  0.38) respectively, 24h after injection. Interestingly, the activity remained stable in the tumor: 2.9% ID/g ( $\pm$  0.45) at 4h and 2.34% ID/g ( $\pm$  0.46) at 24h; At 48h and 72h after injection, the activity in the tumor was greater than activity in many other organs (especially liver, heart, spleen and kidney), around 2% ID/g (**Figure 5**). These results demonstrated a concentration of the activity related to the differential expression of the CD105 antigen in the tissues and organs as observed in immunohistochemical study.

#### Radioimmunotherapy with $^{213}\text{Bi}$

In mice treated with a single injection of the non-specific radioimmunoconjugate  $^{213}\text{Bi}$ -OKT3, a tumoral growth delay was noticed at the injected activity of 11.1 MBq. At 77 days after RIT, the relative tumoral volume (tumoral volume at day 77/ tumoral volume at day 0) reached 7 compared to a relative tumoral volume of 17.5 in control mice. This was likely to be due to the non-specific toxicity of alpha particles at high activities ( $p=0.0061$ ). The relative tumoral volume at day 77, in mice injected with 3.7 MBq of  $^{213}\text{Bi}$ -OKT3, was comparable to the relative tumoral volume in control mice at the same time point.

In mice treated with a single injection 11.1 MBq of  $^{213}\text{Bi}$ -BB-4, targeting the tumor cells and not the vasculature, the relative tumoral volume at day 77 reached 8.5 ( $p=0.0051$  comparing to control mice).

In mice treated with a single injection 3.7 MBq of  $^{213}\text{Bi}$ -MJ7/18, the anti-murine cD105 antibody, the relative tumoral volume reached 11. So, tumoral growth delay was observed with a three-fold smaller injected activity (3.7 MBq instead of 11.1 MBq) after anti-CD105 RIT, which revealed the high efficiency and the relevance of this target (**Figure 6**).

#### Fractionated radioimmunotherapy with $^{211}\text{At}$

In mice treated with two injections of  $^{211}\text{At}$ -MJ7/18, a tumoral growth delay was observed. After each injection (day 0 and day 66 after RIT, corresponding to day 24 and day 90 after tumoral engraftment), a stabilization of the tumoral growth was noticed and was illustrated by two stagnations between day 0 and day 10 after the first injection and between day 60 and day 75, after the second injection. These preliminary results confirmed those obtained with  $^{213}\text{Bi}$ -MJ7/18 and underlined the interest of a fractionated radiotherapy targeting the CD105 antigen (**Figure 7**).

## **Discussion**

Angiogenesis is a crucial step for tumor development and metastasis. Vascular targeting is theoretically a good approach to limit tumoral growth but it could lead to toxic effects on normal vascular structures. Angiogenesis inhibitors (angiostatin, endostatin and thrombospondin), monoclonal antibodies against VEGF (bevacizumab) or tyrosine kinase receptor inhibitors (sorafenib, sunitinib, and semaxanib) are evaluated to date in cancer therapies <sup>(5)</sup>. However, these treatments lack specificity and adverse effects are frequent. So there is a need to determine a specific marker of tumor vessels, in order to limit toxicity and to improve efficiency.

In the wide range of currently available endothelial specific antibodies, two categories can be defined: the pan-endothelial cell markers (as CD31 or vWF) <sup>(13, 28)</sup> and the antibodies which are reported to bind preferentially to proliferating endothelium (as CD105). In this study, we aimed to evaluate the interest of CD105 compared to other endothelial antigen in order to target specifically neoplastic stromal vessels.

In normal murine tissues, CD31 was strongly expressed by all vascular structure in most of the examined organs <sup>(9)</sup>. In murine tumoral tissues, CD31 stained both large and small vessels with equal intensity in peritumoral and intratumoral areas. It appears that CD31 is a ubiquitous marker of vessels (and some other cells as platelets, monocytes, neutrophils and

plasma cells) and that it could not be a relevant target for tumoral vessel targeting, because of a great risk of toxicity against normal blood vessels.

The expression of vWF is known to be largely restricted to large vessels, whereas its expression tends to decrease in capillaries and sinus endothelial cells<sup>(17)</sup>. The variability of vWF expression on endothelial cells may be related to the maturation status of the cell. In the present study, we noticed that vWF was expressed on endothelial cells of large vessels but not in normal capillaries. In murine tumoral tissues, vWF stained mainly large and mature vessels in peritumoral areas. In all tumoral cell lines (MC38, 5T33 or MDAMB468), intratumoral immature vessels were negative for vWF. vWF is not therefore a good target, because of the high risk of toxicity on mature vascular structure and because of the lack of vWF expression by intratumoral capillaries.

Anti-CD105 antibody targets endoglin, which is known to be expressed, in humans, throughout the process of vasculogenesis. In this study on murine tissues, CD105 was strongly expressed by small vessels (capillaries in kidney, liver, bone marrow, uterus and adrenals) but weakly or not by arteries, arterioles and veins in normal organs. In tumoral tissues, it strongly stained small vessels around and inside the tumor.

Anti-CD105 antibody, by highlighting a high number of the proliferating vessels in tumors, is a more specific and sensitive marker for tumor angiogenesis than the commonly used pan endothelial markers<sup>(4)</sup>. One of the most interesting finding, with respect to CD105, was its ability to preferentially stain endothelial cells within neoplastic tissue. This was in contrast to established markers such as CD31 or von Willebrand factor, which do not differentiate between neoplastic and normal vessels. The significance of this finding has multiple applications. First, assessments of intratumoral microvascular density by CD105 detection will be more accurate, staining newly-formed vessels and not preformed established vessels. Second, the specificity of CD105 has a great therapeutic potential with the possibility for a drug targeting CD105 to preferentially destroy intratumoral vessels.

The biodistribution study using <sup>125</sup>I-MJ7/18 injected to xenografted mice showed an early location of the antibody in lung, liver, heart, spleen, and kidney 4 hours after injection. These data were in accordance to the immunohistochemical data, obtained with MJ7/18. Twenty-four hours after injection, there was a dramatic decrease of antibody uptake in these organs.

The high activity found in lungs rapidly decreased to reach similar levels than other organs (liver or kidney) at 24h. Hong et al., using TRC105-<sup>89</sup>Zr (a chimeric human/mouse antibody against CD105) in PET imaging, showed an uptake on liver and spleen due to a non specific harnessing by the splenic and hepatic resident macrophages<sup>(Hong)</sup>. In our study, the

biodistribution experiments pointed out a relative poor tumor uptake (3% ID/g) 4 hours after injection. However the tumor uptake remained stable between 4h and 72h (around 2% ID/g), contrary to other organs. At 48h and 72h, the activity was higher in the tumor tissue than in other organs. MJ7/18 targets endothelial cells, but these cells were less numerous than tumor cells in a tumoral mass. So the density of the targeted antigen was smaller and could explain the relatively poor tumoral uptake of MJ7/18, which may not impair antivasculature therapeutic effects.

In the RIT experiments, several antibodies were coupled with  $^{213}\text{Bi}$  and injected once in mice xenografted with MDAMB468 cells. OKT3 is an antibody against  $\gamma$  chain of human CD3 (non relevant antibody), B-B4 antibody targets human CD138, a heparan sulphate proteoglycan expressed on MDAMB468 cell membrane (antitumor relevant antibody acting as positive control) and MJ7/18 targets murine CD105.

There was no effect of injection of 3.7 MBq of  $^{213}\text{Bi}$ -OKT3, compared to control mice. However, injection at an activity of 11.1 MBq induced a reduced tumoral growth. These results revealed probably a non specific systemic toxicity (including tumor tissue) due to this high injected activity. There was no effect of injection of  $^{213}\text{Bi}$ -B-B4 at the activity of 3.7 MBq. Nevertheless, as for  $^{213}\text{Bi}$ -OKT3, injection of  $^{213}\text{Bi}$ -B-B4 at the activity of 11.1 MBq induced a reduced tumoral growth. These results were similar to those obtained with the irrelevant OKT3 antibody, probably due to the weak diffusion of B-B4 inside the tumor, incompatible with the short half-life of  $^{213}\text{Bi}$  (45 minutes).

In the same model, the MJ7/18 antibody coupled with  $^{213}\text{Bi}$  induced a tumoral growth delay at a less toxic injected activity of 3.7 MBq. The reduction of tumoral growth was the same for mice injected with 3.7 MBq of  $^{213}\text{Bi}$ -MJ7/18 than for mice injected with the more toxic activity of 11.1 MBq of  $^{213}\text{Bi}$ -MJ7/18. It suggested that targeting endothelial cells with a specific antibody radiolabelled by  $^{213}\text{Bi}$  was more efficient than targeting tumoral cells themselves, probably because of the rapid accessibility of the targeted endothelial cells compared to tumoral cells.

Furthermore, this activity of 3.7 MBq did not show any renal, hepatic or hematological toxicity (unpublished data) and could be thus combined with other therapies. When coupled with  $^{211}\text{At}$  and injected twice in mice xenografted with MDAMB468 cells, MJ7/18 led to a transient similar tumoral growth delay after each injection.

In conclusion, the present study has examined the immunoreactivity of murine endothelial cells in a wide range of normal and neoplastic tissues with a panel of antibodies against well-

characterized endothelial antigens, and has emphasized the phenotypic heterogeneity of endothelial cells. Targeting specifically tumoral vessels is crucial to avoid adverse toxic effects. For example, the bevacizumab (a monoclonal antibody against VEGF) could be toxic as it targets a ubiquitous vascular peptide. So, it is of a great usefulness to test new more specific antigen, as CD105, to better target intratumoral vessels. Murine CD105 is strongly expressed in the vascular endothelium of tumor tissues, whereas the expression is weaker in the vascular endothelium of normal tissues. CD105 may be an interesting cellular target for preclinical research in mouse models of antibody-mediated therapies, among which alpha RIT. Biodistribution study confirmed immunohistochemical data. These preliminary results demonstrated that targeting CD105 with alpha radionuclides seemed to be a promising anticancer strategy.

## References

- 1- Akabani G, Lendon R, Bigner DD, Zalutsky MR. Vascular targeted endoradiotherapy of tumors using alpha-particle-emitting compounds: theoretical analysis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2002;54(4):1259–1275.
- 2- Apostolidis C, Molinet R, Rasmussen G, Morgenstern A. Production of Ac-225 from Th-229 for Targeted alpha Therapy. *Anal. Chem.* 2005;77(19):6288–6291.
- 3- Behr TM, Béhé M, Stabin MG, Wehrmann E, Apostolidis C, Molinet R, et al. High-linear energy transfer (LET)  $\alpha$  versus low-LET  $\beta$  emitters in radioimmunotherapy of solid tumors : therapeutic efficacy and dose-limiting toxicity of 213 Bi- versus 90 Y-labeled CO17-1A Fab ' fragments in a human colonic cancer model. *Cancer Res.* 1999;59:2635–2643.
- 4- Behrem S, Zarkovic K, Eskinja N, Jonjic N. Endoglin is a better marker than CD31 in evaluation of angiogenesis in glioblastoma. *Croat. Med. J.* 2005;46(3):417–422.
- 5- Burke PA, DeNardo SJ. Antiangiogenic agents and their promising potential in combined therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2001;39:155–171.
- 6- Bourgeois M, Guerard F, Alliot C, Mougin-Degraef M, Rajérison H, Remaud-Le Saëc P, Gestin J-F, Davodeau F, Chérel M, Barbet J, Faivre-Chauvet A. Feasibility of the radioastatination of a monoclonal antibody with astatine-211 purified by wet extraction. *Journal of labeled compounds and radiopharmaceuticals*, 2008; 51: 379-383.
- 7- Chérel M, Gouard S, Gaschet J, Saï-Maurel C, Bruchertseifer F, Morgenstern A, et al. 213Bi radioimmunotherapy with an anti-mCD138 monoclonal antibody in a murine model of multiple myeloma. *J. Nucl. Med.* 2013;54(9):1597–1604.

- 8- Dallas NA, Samuel S, Xia L, Fan F, Gray MJ, Lim SJ, et al. Endoglin ( CD105 ): A marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clin. Dev. Immunol.* 2008;14(7):1931–1937.
- 9- Elia A, Charalambous F, Georgiades P. New phenotypic aspects of the decidual spiral artery wall during early post-implantation mouse pregnancy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011;416(1-2):211–216.
- 10- Erdem O, Taskiran C, Onan MA, Erdem M, Guner H, Ataoglu O. CD105 expression is an independent predictor of survival in patients with endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* 2006;103(3):1007–1011.
- 11- Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl.* 1990;82(1):4–7.
- 12- Fonsatti E, Nicolay HJM, Altomonte M, Covre A, Maio M. Targeting cancer vasculature via endoglin/CD105: a novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours. *Cardiovasc. Res.* 2010;86(1):12–19.
- 13- Fox SB, Harris AL. Histological quantitation of tumour angiogenesis. *APMIS.* 2004;112(7-8):413–430.
- 14- Hartmann F, Horak EM, Garmestani K, Wu C, Brechbiel MW, Kozak R V, et al. Radioimmunotherapy of Nude mice bearing a human interleukin 2 receptor  $\alpha$  -expressing lymphoma utilizing the  $\alpha$ -emitting radionuclide-conjugated monoclonal antibody 212 Bi-anti-Tac. *Cancer Res.* 1994;54:4362–4370.
- 15- Hong H, Zhang Y, Severin GW, Yang Y, Engle JW, Niu G, et al. Multimodality imaging of breast cancer experimental lung metastasis with bioluminescence and a monoclonal antibody dual-labeled with (89)Zr and IRDye 800CW. *Mol. Pharm.* 2012;9:2339–2349.
- 16- Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, et al. Breast carcinoma : vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res.* 1999;50:856–861.
- 17- Kuzu I, Bicknell R, Harris AL, Jones M, Gatter KC, Mason DY. Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumours. *J. Clin. Pathol.* 1992;45(2):143–148.
- 18- Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, et al. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science.* 1999;284(5419):1534–1537.
- 19- Loisel S, Ohresser M, Pallardy M, Daydé D, Berthou C, Cartron G, Watier H. Relevance, advantages and limitations of animal models used in the development of monoclonal

- antibodies for cancer treatment. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2007;: 62(1), 34–42.
- 20- Matsuno F, Haruta Y, Kondo M, Tsai H, Barcos M, Seon BKS. Induction of lasting complete regression of preformed distinct solid tumors by targeting the tumor vasculature using two new anti-endoglin monoclonal antibodies. *Clin. Cancer Res*. 1999;5:371–382.
- 21- McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, et al. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat. Genet*. 1994;8:345–351.
- 22- Nikiteas NI, Tzanakis N, Theodoropoulos G, Atsaves V, Christoni Z, Karakitsos P, et al. Vascular endothelial growth factor and endoglin (CD-105) in gastric cancer. *Gastr cancer*. 2007;10:12–17.
- 23- Nikula TK, Curcio MJ, Brechbiel MW, Gansow OA, Finn RD, Scheinberg DA. A rapid, single vessel method for preparation of clinical grade ligand conjugated monoclonal antibodies. *Nucl. Med. Biol*. 1995;22(3):387–390.
- 24- Saad RS, Liu YL, Nathan G, Celebrezze J, Medich D, Silverman JF. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. *Mod. Pathol*. 2004;17(2):197–203.
- 25- Sugita Y, Takase Y, Mori D, Tokunaga O, Nakashima A, Shigemori M. Endoglin (CD 105) is expressed on endothelial cells in the primary central nervous system lymphomas and correlates with survival. *J. Neurooncol*. 2007;82(3):249–256.
- 26- Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, Kawano Y, Miyahara R, Li M, et al. Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer : Comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin. Cancer Res*. 2001;7:3410–3415.
- 27- Thorpe PE, Burrows FJ. Antibody-directed targeting of the vasculature of solid tumors. *Breast Cancer Res. Treat*. 1995;36(2):237–251.
- 28- Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur. J. Cancer*. 1996;32A(14):2474–2484.
- 29- Wikström, P., Lissbrant, I. F., Stattin, P., Egevad, L., & Bergh, A. (2002). Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. *The Prostate*, 51(4), 268–275.
- 30- Yagasaki H, Kawata N, Takimoto Y, Nemoto N. Histopathological analysis of angiogenic factors in renal cell carcinoma. *Int. J. Urol*. 2003;10(4):220–227.
- 31- Yagmur E, Rizk M, Stanzel S, Hellerbrand C, Lammert F, Trautwein C, Wasmuth HE,

Gressner AM. Elevation of endoglin (CD105) concentrations in serum of patients with liver cirrhosis and carcinoma. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 2007;19(9), 755-761.

Table 1: Comparison between CD31, von Willebrand factor and CD105 immunoreactivity on normal murine tissues (-: no immunoreactivity, +: weak immunoreactivity, ++: moderate immunoreactivity, +++: strong immunoreactivity).

<b>Tissues</b>	<b>Vessel-type</b>	<b>CD31</b>	<b>vWF</b>	<b>CD105</b>
<b>Kidney</b>	Glomerular capillaries	+++	-	+++
	Interstitial capillaries	+++	-	+++
	Interlobular veins	++	++	++
	Interlobular arteries	+++	+++	+
<b>Liver</b>	Sinusoidal endothelium	+++	-	++
	Central veins	++	++	++
	Portal veins	++	++	-
	Portal arteries	+++	+++	-
<b>Lung</b>	Alveolar septal capillaries	+++	-	+
	Veins	+++	+++	-
	Arteries	+++	+++	-
<b>Skin</b>	Superficial vessels	++	++	-
	Deep vessels	+++	+++	-
	Lymphatic vessels	-	++	-
<b>Bone marrow</b>	Sinusoidal endothelium	+	-	+++
<b>Spleen</b>	Sinus	-	-	-
	Red pulp capillaries	-	-	-
	Central arteries	-	+++	-
	Trabecular arteries	++	+++	-
<b>Cerebrum and cerebellum</b>	Capillaries	+++	++	-
	Venules	++	+++	-
	Arterioles	+++	+++	-
<b>Esophagus (mucosa and sub-mucosa)</b>	Capillaries	++	-	++
	Venules	+++	+++	++
	Arterioles	+++	+++	-

<b>Stomach (mucosa and sub-mucosa)</b>	Capillaries	++	-	-
	Venules	+++	+++	-
	Arterioles	+++	+++	-
<b>Small intestine (mucosa and sub-mucosa)</b>	Capillaries	++	-	-
	Chyliferous vessels	-	++	-
	Venules	+++	++	-
	Arterioles	+++	+++	-
<b>Large intestine (mucosa and sub-mucosa)</b>	Capillaries	++	+	-
	Venules	++	++	-
	Arterioles	+++	+++	-
<b>Adrenal gland</b>	Cortical capillaries	+	-	+
	Medullary capillaries	++	-	+++
	Central vein	+++	++	+++
<b>Uterus</b>	Capillaries	+++	-	+++
	Venules	+++	++	+++
	Arterioles	+++	+++	-

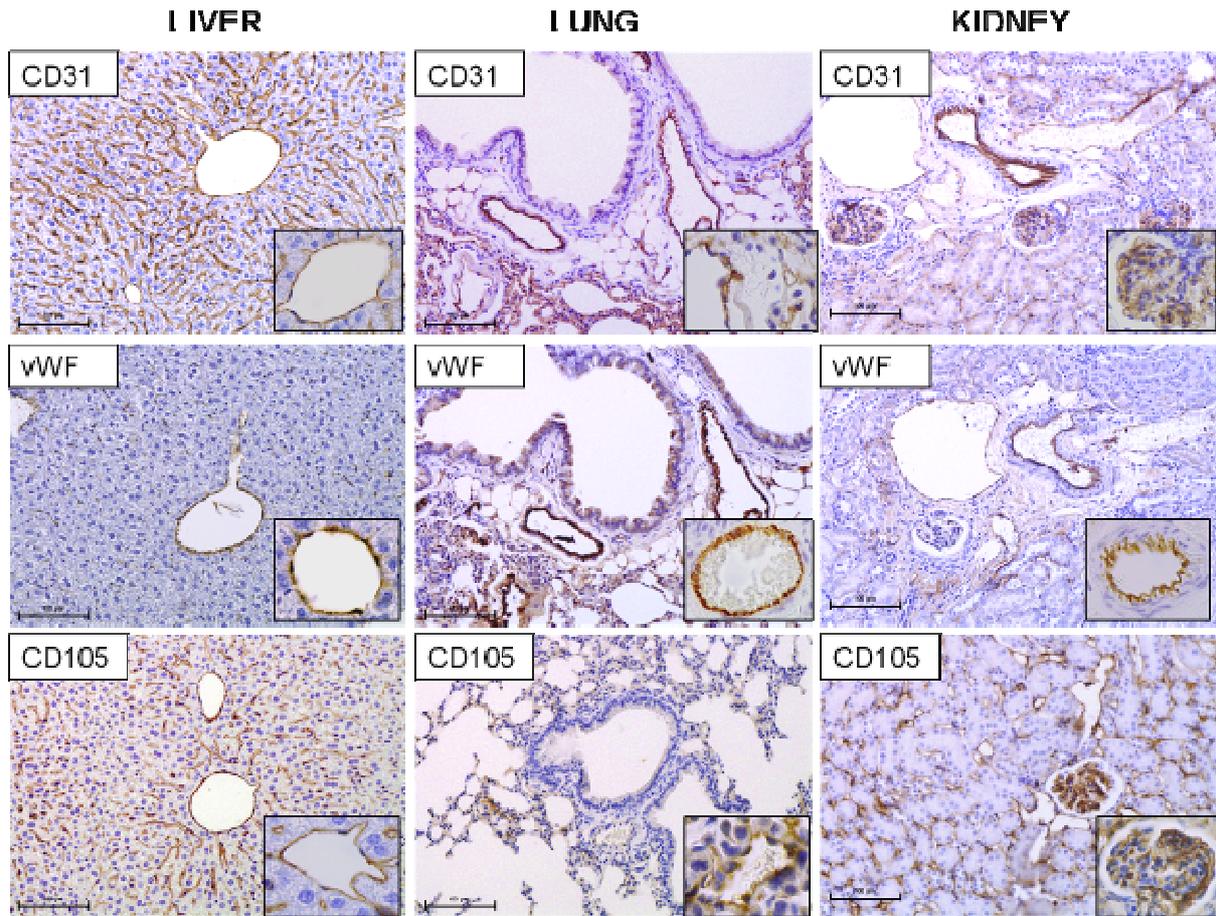
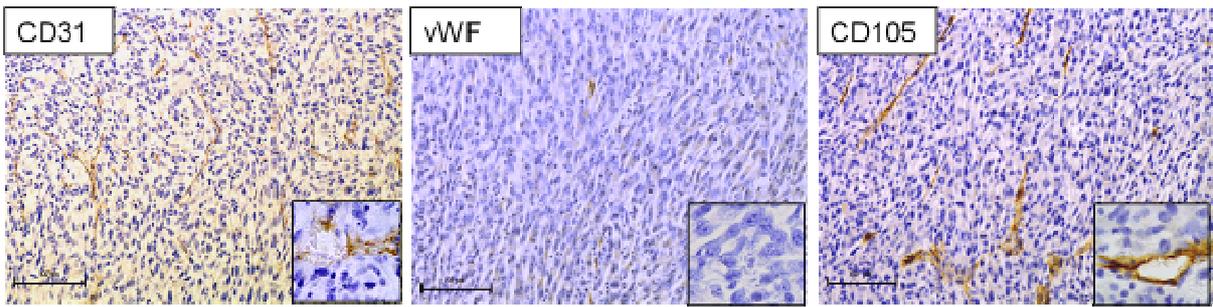


Figure 1: CD31, vWF and CD105 immunohistochemistry on normal murine tissues (x200, insert x400)

Table 2: Comparison between CD31, von Willebrand factor and CD105 immunoreactivity on tumoral murine tissues (-: no immunoreactivity, +: weak immunoreactivity, ++: moderate immunoreactivity, +++: strong immunoreactivity).

<b>Tumors</b>	<b>Vessel-type</b>	<b>CD31</b>	<b>vWF</b>	<b>CD105</b>
<b>MC38</b> (murine colon cell line)	Intratumoral capillaries	+++	-	+++
	Peritumoral arteries	+++	+++	+
	Peritumoral veins	+++	+++	++
<b>5T33</b> (murine multiple myeloma cell line)	Intratumoral capillaries	+++	-	+++
	Peritumoral arteries	+++	+++	+
	Peritumoral veins	+++	+++	++
<b>MDAMB468</b> (human breast cancer cell line)	Intratumoral capillaries	+++	-	+++
	Peritumoral arteries	+++	+++	+
	Peritumoral veins	+++	+++	++

**Intratumoral area**



**Peritumoral area**

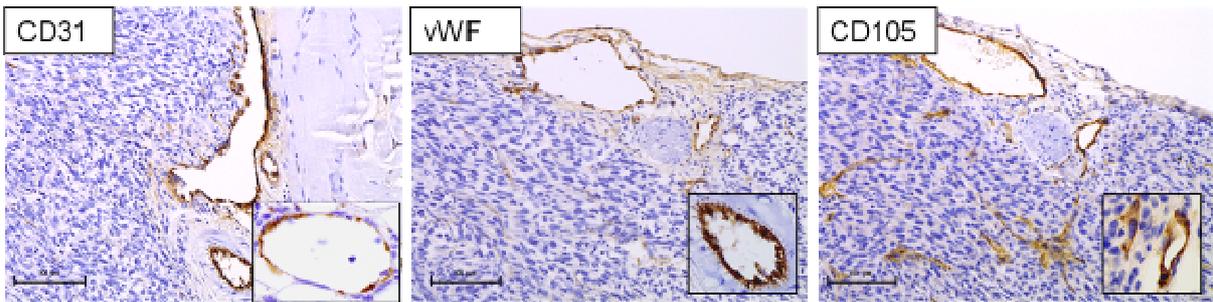
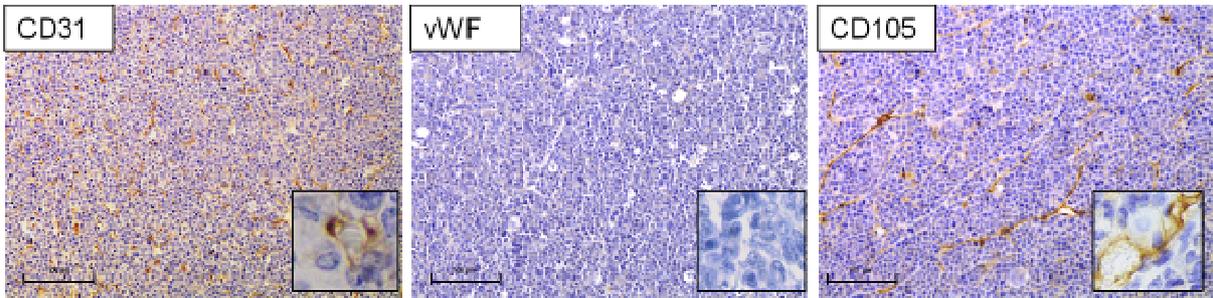


Figure 2: CD31, vWF and CD105 immunohistochemistry on tumoral murine tissue (graft of murine colon cancer cell line MC38, x200, insert x400).

**Intratumoral area**



**Peritumoral area**

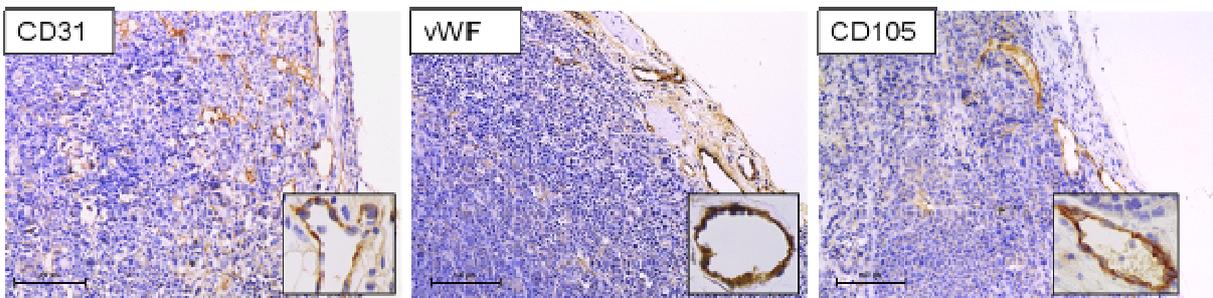
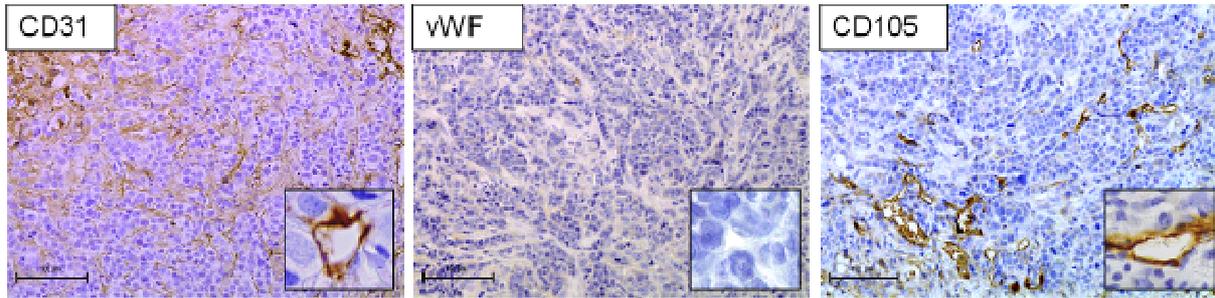


Figure 3: CD31, vWF and CD105 immunohistochemistry on tumoral murine tissue (graft of murine multiple myeloma cell line 5T33, x200, insert x400).

**Intratumoral area**



**Peritumoral area**

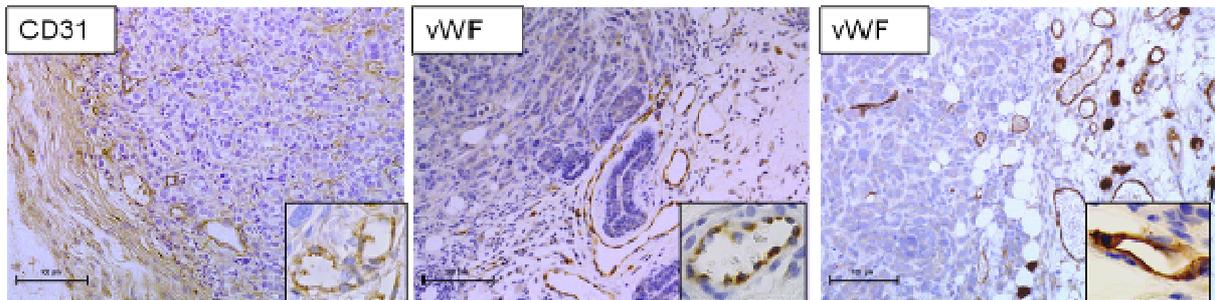


Figure 4: CD31, vWF and CD105 immunohistochemistry on tumoral murine tissue (xenografted human breast cancer cell line MDAMB468, x200, insert x400).

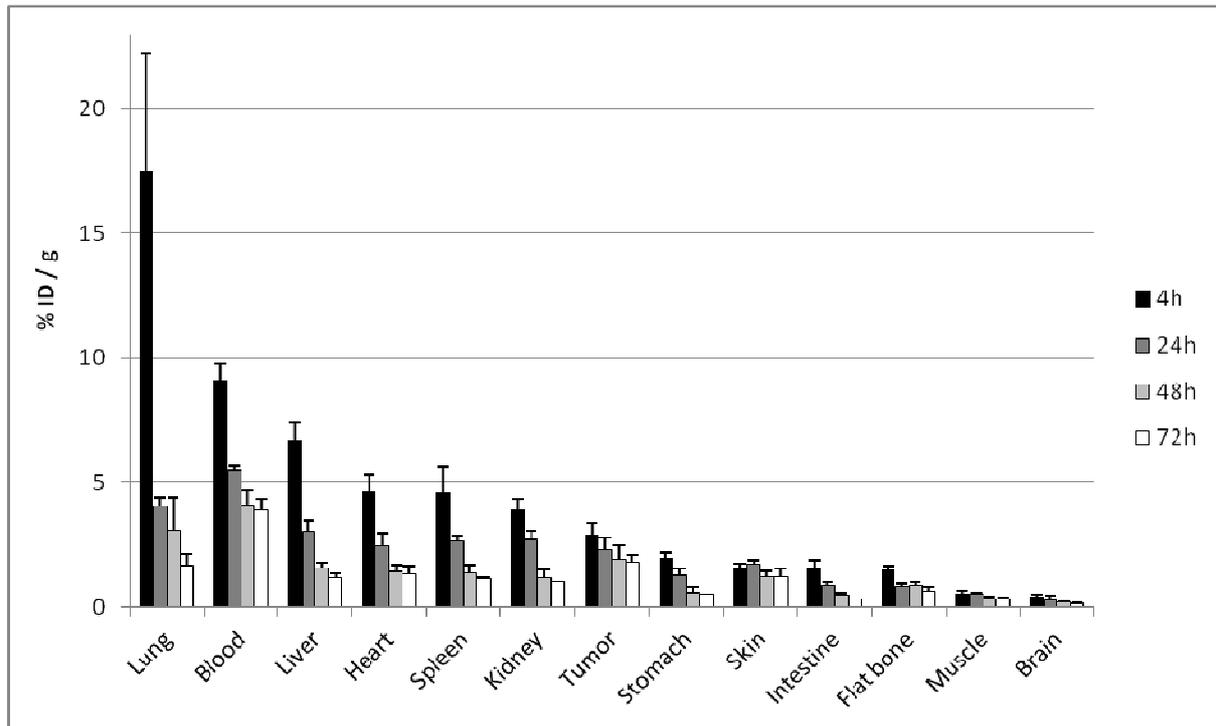


Figure 5: Biodistribution study following  $^{125}\text{I}$ -MJ7/18 intravenous injection evaluated at 4, 24, 48 and 72 h after injection

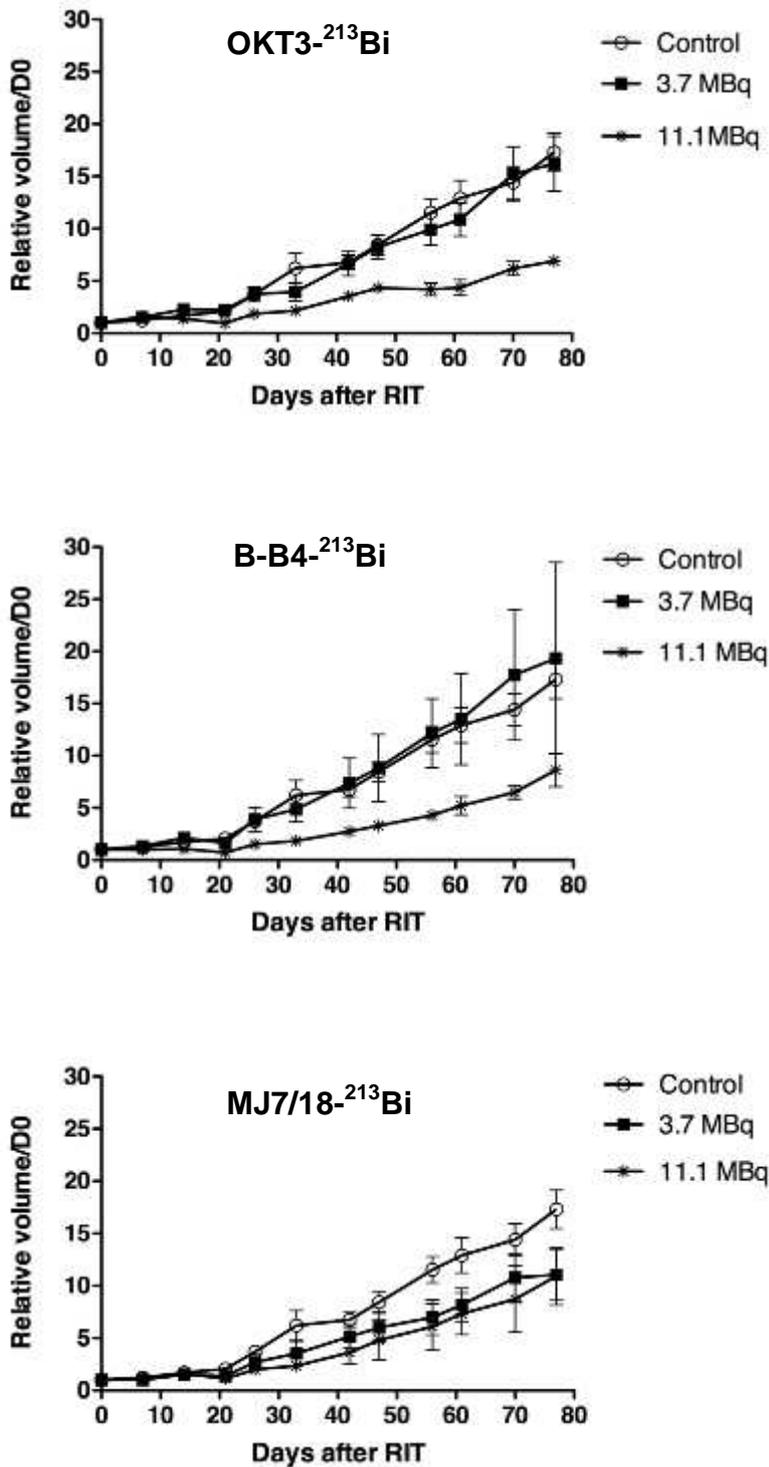


Figure 6: Follow-up of relative tumoral volume in mice xenografted with MDAMB468 cells and treated, 24 days after engraftment, with a single injection OKT3 (non specific antibody), or B-B4 (anti-CD138 antibody) or MJ7/18 (anti-CD105 antibody) coupled with 213-bismuth.

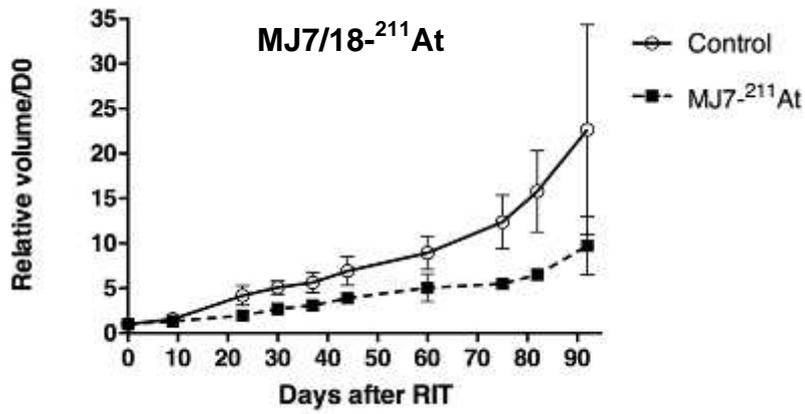
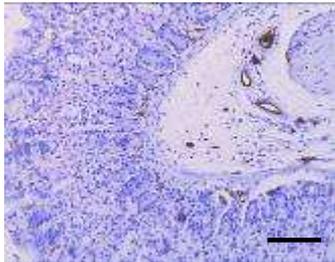
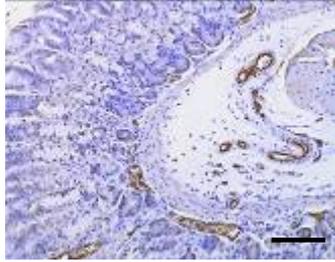
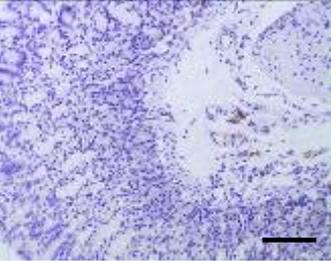
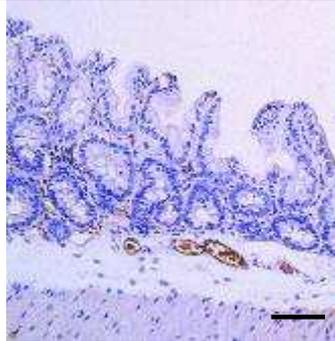
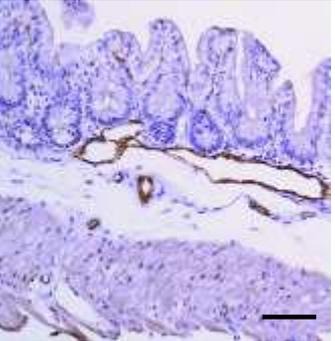
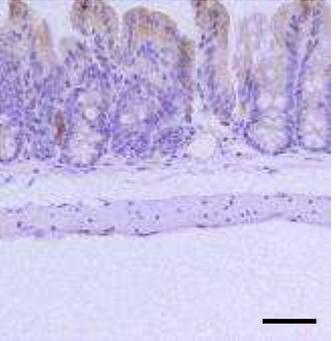
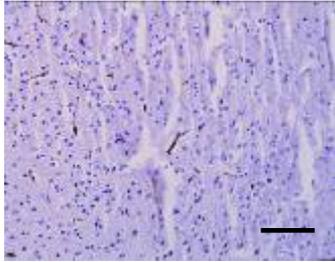
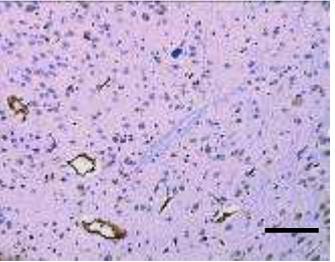
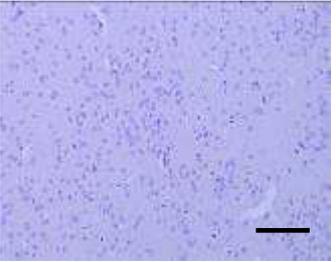
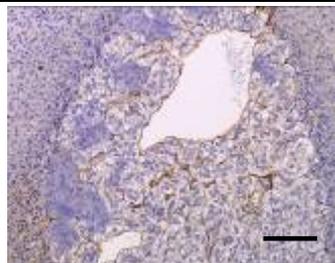
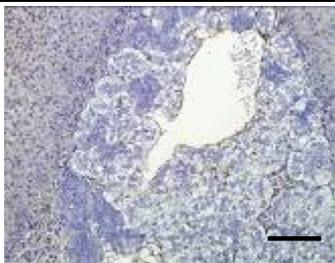
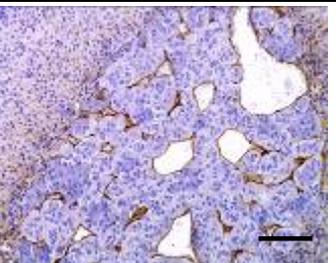


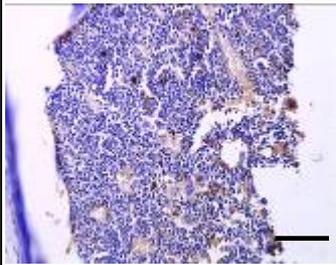
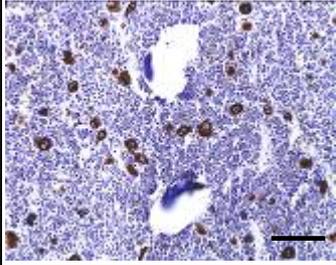
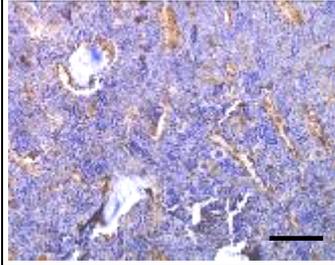
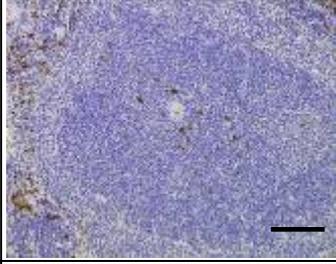
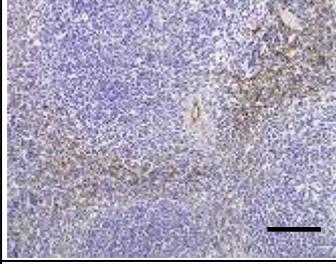
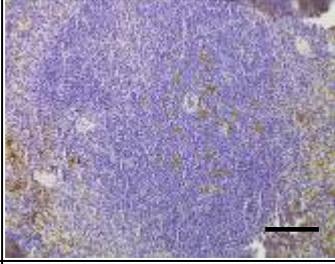
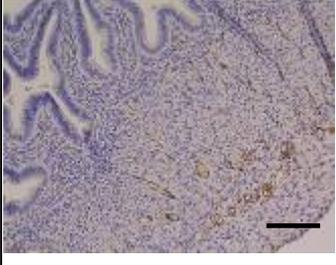
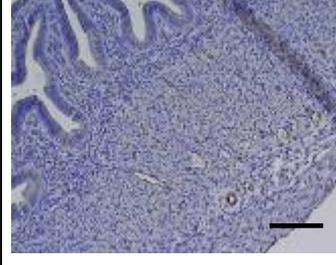
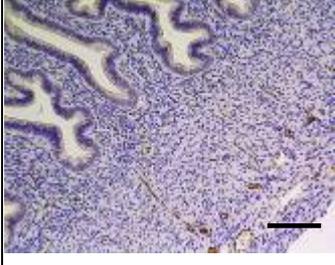
Figure 7: Follow-up of relative tumoral volume in mice xenografted with MDAMB468 cells and treated, with two injections of MJ7/18 (anti-CD105 antibody) coupled with 211-astatine at day 0 and day 66 after RIT (corresponding to day 24 and day 90 after engraftment)

**Complément à l'article 2**

L'immunohistochimie anti-CD105 a été réalisée sur de nombreux organes sains. Les résultats sont présentés dans le **tableau XIII**, en complément de l'article précédent.

**Tableau XIII : Immunohistochimie comparative CD31, vWF et CD105 sur les organes murins normaux**  
(barre = 100  $\mu$ m)

Organe	CD31	VWF	CD105
<b>Estomac (x20)</b>			
<b>Caecum (x20)</b>			
<b>Encéphale (x20)</b>			
<b>Surrénale (x20)</b>			

<b>Organe</b>	<b>CD31</b>	<b>VWF</b>	<b>CD105</b>
<b>Moelle osseuse (x20)</b>			
<b>Rate (x20)</b>			
<b>Utérus (x20)</b>			

## V- Conclusions de la deuxième partie

Le ciblage du réseau vasculaire tumoral, associé à la forte cytotoxicité des particules  $\alpha$ , permet de limiter la croissance tumorale. Cette approche permet de s'affranchir de certains obstacles rencontrés au cours de chimiothérapies classiques :

- la chimiorésistance des cellules tumorales,
- le problème de la biodistribution et de l'accessibilité des anticorps thérapeutiques à la tumeur,
- l'hétérogénéité des cellules tumorales et l'instabilité génétique qui en découle.

L'antigène CD105, fortement exprimé par les capillaires intratumoraux et faiblement par les vaisseaux sanguins normaux, se révèle donc être une cible pertinente dans le cadre d'une thérapie ciblant la vascularisation tumorale.

Nous avons obtenu de premiers résultats prometteurs démontrant un ralentissement de la croissance tumorale lors d'une RIT  $\alpha$  utilisant l'anticorps anti-CD105 murin (MJ7/18) couplé au  $^{213}\text{Bi}$  à une activité de 3.7 MBq, activité non toxique telle que démontrée dans la première partie de ce travail. À cette activité, l'effet obtenu avec le MJ7/18 est supérieur à celui observé soit avec un anticorps spécifique de la tumeur, soit avec un anticorps non spécifique. Ces résultats ont également été obtenus en couplant le MJ7/18 avec un autre émetteur  $\alpha$ , l' $^{211}\text{At}$ , en injections répétées. Ces résultats méritent une confirmation par une RIT de plus grande ampleur et appliquée à d'autres types tumoraux.

À titre indicatif, lors d'une étude de phase I chez l'homme, les effets secondaires notés avec une thérapie anti-CD105 nu (TRC-105) sont :

- une anémie, résultant de la suppression des précurseurs érythroïdes de la moelle osseuse exprimant le CD105,
- des télangiectasies,
- et des réactions locales au point d'injection [177].

Cependant, l'étude complète de la toxicité à long terme du MJ7/18 couplé au  $^{213}\text{Bi}$  reste encore à effectuer. Notre étude se heurte à l'évaluation de l'immunoréactivité du CD105. En effet, il n'existe pas de cellules en culture exprimant le CD105 à un niveau suffisant pour nous permettre de réaliser ces tests d'immunoréactivité et ainsi de caractériser cet anticorps en termes

d'affinité. Il est possible de contourner cet obstacle en transfectant des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) avec le gène du CD105 murin.

L'utilisation d'une RIT  $\alpha$  ciblant le CD105 ne saurait constituer un traitement anticancéreux à part entière. Il est donc nécessaire de l'intégrer dans une approche de thérapies combinées, afin d'obtenir un effet potentialisateur et de limiter la toxicité. En effet, de nombreuses études rapportent des effets obtenus après couplage d'agents ciblant la vascularisation tumorale et la radiothérapie (combrestatine et RIT  $\beta$  [164], paclitaxel et RIT  $\alpha$  [109], angiostatine et irradiation X [82], anti-VEGF et irradiation  $\gamma$  [121], anti-VEGF et irradiation X [83]). Ces associations conduisent principalement à une suppression de la croissance tumorale ainsi qu'une diminution de la pression interstitielle et de l'hypoxie intratumorales.

## Troisième partie : Radioimmunothérapie alpha et immunomodulation

Il est bien connu que le système immunitaire joue un rôle dans le contrôle de la croissance tumorale. En effet, il existe une corrélation positive entre l'importance de l'infiltration de la tumeur par des lymphocytes T effecteurs et la survie. De plus, le risque de développer un cancer est accru chez les patients immunodéprimés. Bien que les patients atteints de cancer développent une réponse immunitaire antitumorale spontanée (humorale et/ou cellulaire), le rejet complet de la tumeur par le système immunitaire est un événement rare. Stimuler le système immunitaire peut donc se révéler être une stratégie thérapeutique prometteuse, illustrée notamment par le bénéfice clinique obtenu chez les patients traités par radiothérapie aux rayons X [87]. Le but de l'immunothérapie consiste donc à stimuler et à exploiter les ressources immunitaires existantes pour les orienter vers une réponse antitumorale efficace. En plus de l'effet direct de la radioactivité sur les cellules tumorales, il est connu depuis longtemps que la radiothérapie peut avoir un effet bénéfique à distance du champ d'irradiation. En 1953, R.J. Mole a qualifié cet effet à distance d'effet abscopal, du latin ab- « éloigné » et -scopus « but, cible ». Ce terme ne s'applique pas uniquement à la radiothérapie mais à toute thérapie locale ayant un effet systémique. Cependant, par elle-même, la radiothérapie est rarement suffisante pour induire une réponse antitumorale thérapeutique suffisante pour éradiquer une tumeur [209].

L'objectif principal de cette troisième partie est l'étude de la réponse immunitaire associée à la radiothérapie interne vectorisée (utilisant des rayonnements  $\alpha$ ), pour préparer une approche combinée du traitement des cancers par les radiopharmaceutiques et par l'immunothérapie.

L'effet abscopal, désigne une régression provoquée par une radiothérapie de tumeurs éloignées de la tumeur irradiée. L'équipe de Demaria a étudié cet effet abscopal lors d'une radiothérapie gamma associée à un traitement par le Flt3-ligand (Flt3-L) et a démontré que cet effet abscopal fait intervenir des lymphocytes T spécifiques de tumeur [50]. La RIT permet d'atteindre par voie systémique des micrométastases inaccessibles à la radiothérapie externe. La

possibilité d'induire une réponse immunitaire au cours du traitement de la maladie résiduelle ou dans des traitements de consolidation offrirait donc l'avantage de mettre en place une mémoire immunologique permettant au patient de faire face à une récurrence de cancer et à son système immunitaire de s'adapter à l'instabilité génomique des cellules tumorales. Nous souhaitons donc investiguer, à partir d'un modèle animal (modèle murin de myélome multiple) la modulation de la réponse immunitaire couplée à la RIT  $\alpha$  par des approches visant à stimuler la réponse antitumorale, au moyen du Flt3-L.

## **I- Introduction**

### **A- Acteurs de la réponse immunitaire antitumorale**

Le concept d'immunité antitumorale a été développé dans de nombreuses études. Les premiers travaux à ce sujet font état d'un rejet de sarcomes murins induits expérimentalement par le 3-méthylchloranthrène [71]. Le rôle majeur de l'immunité cellulaire a été mis en évidence par les travaux d'Eberlein suivi des travaux appliqués de Rosenberg sur les immunothérapies antitumorales concernant le lymphome [60]. Le support mécanistique de cette immunité antitumorale est constitué par différents acteurs cellulaires de l'immunité, parmi lesquels les lymphocytes T, les cellules dendritiques et les cellules NK.

#### **1- Lymphocytes T**

Les lymphocytes T sont les acteurs principaux de la réponse immunitaire adaptative cellulaire. Ils présentent des récepteurs membranaires, appelés TCR (T Cell Receptor), permettant la reconnaissance des peptides antigéniques présentés par les molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) situées à la surface des CPA (Cellules Présentatrices d'Antigène). Les lymphocytes T peuvent difficilement être activés par des antigènes solubles ; c'est pourquoi, la présentation d'antigènes transformés et liés à la membrane par des CPA est une étape cruciale de l'induction de l'immunité cellulaire.

#### a- Lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (helper)

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> représentent environ 60 à 70% des lymphocytes T matures. La lyse des cellules tumorales libère des antigènes qui peuvent être captés par des CPA. Ces dernières, après internalisation des motifs antigéniques, les présentent aux lymphocytes CD4<sup>+</sup> grâce aux molécules du CMH de classe II. Les lymphocytes CD4<sup>+</sup> sont constitués de différents sous-types dont les actions sont tantôt antitumorales, tantôt protumorales [234].

##### *Les lymphocytes Th1*

Les lymphocytes Th1 sécrètent majoritairement de l'IFN- $\gamma$  (Interféron  $\gamma$ ), du TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) et de l'IL-2 (Interleukine 2). Ils induisent les réponses immunes cellulaires les plus efficaces contre les cellules infectées par les virus et les bactéries. Ces cellules sont aussi impliquées dans les maladies auto-immunes [234].

##### *Les lymphocytes Th2*

Les lymphocytes Th2 présentent un autre profil de production cytokinique, avec une sécrétion majoritaire d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13. Ils soutiennent la différenciation des lymphocytes B pour la production d'anticorps. L'IL-5 est particulièrement importante pour la production d'IgE et l'action des granulocytes éosinophiles, favorisant l'élimination des parasites extracellulaires comme les helminthes. Cependant, les lymphocytes Th2 favorisent les maladies allergiques [234].

Il a été démontré que le développement de ces sous-populations était mutuellement antagoniste : l'IFN- $\gamma$  («signature» des lymphocytes Th1) bloque le développement des lymphocytes Th2 *via* l'inhibition de la production d'IL-4 («signature» des lymphocytes Th2) et réciproquement. Une amplification positive s'établit pour une des deux sous-populations, résultant en une polarisation fonctionnelle de la réponse immune en fonction des cytokines présentes dans le microenvironnement cellulaire.

### *Les lymphocytes Th17*

Plus récemment d'autres profils de sécrétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> effecteurs ont été décrits. Les cellules Th17 produisent de l'IL-17, de l'IL-22 (« signatures » des lymphocytes Th17) et de l'IL-21. Ces cellules sont importantes pour le contrôle des infections bactériennes extracellulaires et fongiques et jouent un rôle dans le recrutement et l'activation des cellules de l'immunité innée comme les granulocytes neutrophiles. Les lymphocytes Th17 peuvent aussi être impliqués dans plusieurs maladies auto-immunes et inflammatoires [235].

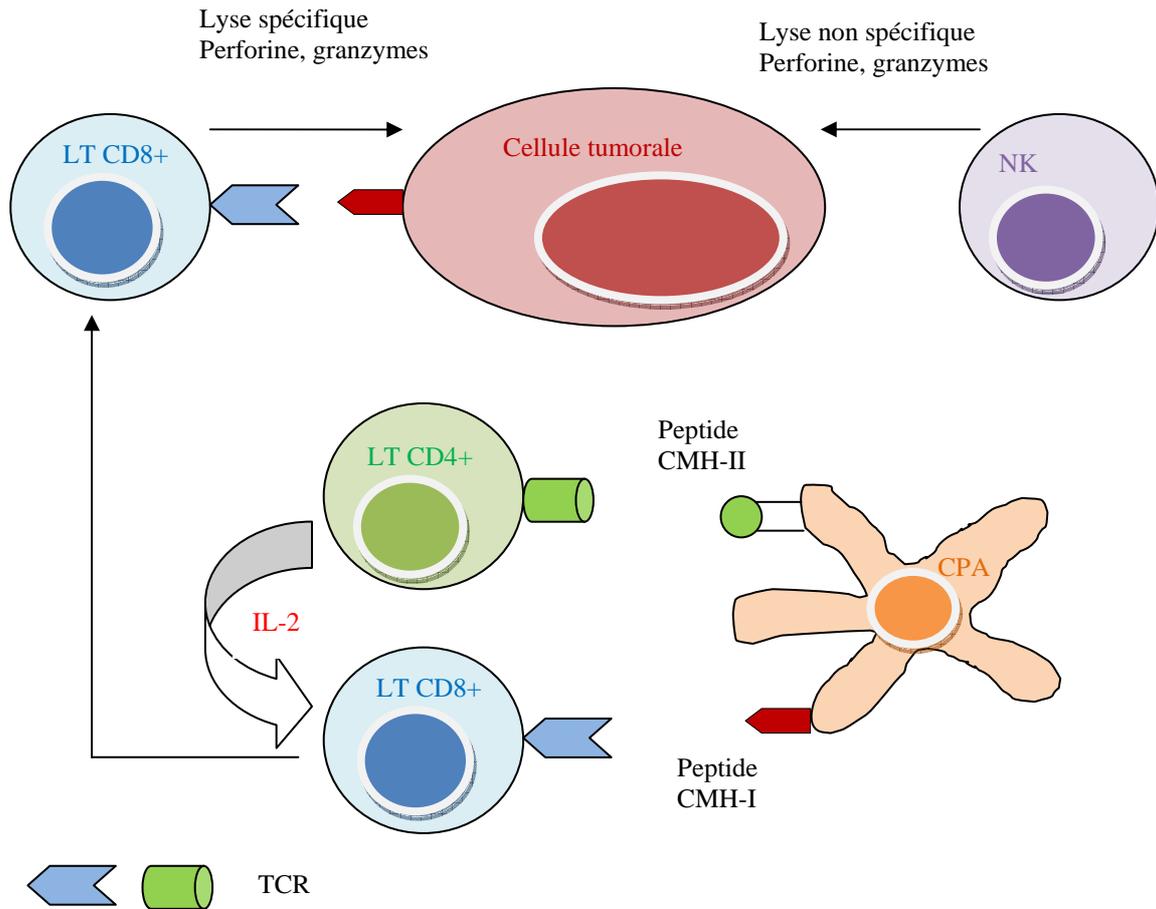
### *Les lymphocytes T régulateurs*

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques des antigènes du soi et expriment le CD25 (récepteur  $\alpha$  à l'IL-2) et le facteur de transcription Foxp3 (Forkhead box P3) à des niveaux élevés. Ils représentent 5 à 10% des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> circulants chez l'homme et la souris [235]. Le rôle des Treg dans l'immunité antitumorale a été pour la première fois mis en évidence dans une expérience où l'injection d'anticorps anti-CD25 à des souris porteuses de tumeurs conduit à l'éradication de ces tumeurs [161]. Le groupe de Zitvogel a montré que lors d'une réponse immunitaire antitumorale, le TGF- $\beta$  produit par les Treg et fixé à leur surface permettait d'inhiber les fonctions effectrices et cytotoxiques des cellules NK (Natural Killer) sur les cellules tumorales [79]. L'immunosuppression induite par les lymphocytes Treg est un des principaux mécanismes d'échappement à la réponse antitumorale et constitue donc un obstacle majeur au succès de l'immunothérapie antitumorale.

Les lymphocytes CD4<sup>+</sup> de type Th1 exercent une action principalement antitumorale [99], alors que les lymphocytes CD4<sup>+</sup> de type Th2 et Treg exercent plutôt une action protumorale. Les lymphocytes CD4<sup>+</sup> Th17 développent tantôt une activité antitumorale [152], tantôt une activité protumorale [180].

### b- Lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (cytotoxiques)

Les cellules tumorales exposent des antigènes à leur surface. L'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> suite à la reconnaissance de ces antigènes par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques entraîne leur lyse (**Figure 18**).



**Figure 18 : Contrôle des cellules tumorales par le système immunitaire**

Les CPA déclenchent la réponse immunitaire spécifique dans les aires T des organes lymphoïdes secondaires.

Ce sont les principaux acteurs de la lyse des cellules tumorales. Ils détruisent leur cible selon trois mécanismes :

- action des perforines qui lysent la membrane plasmique de la cellule tumorale,
- action des granzymes qui entrent ensuite dans la cellule et la lysent,
- induction d'apoptose par le système Fas-Fas-ligand.

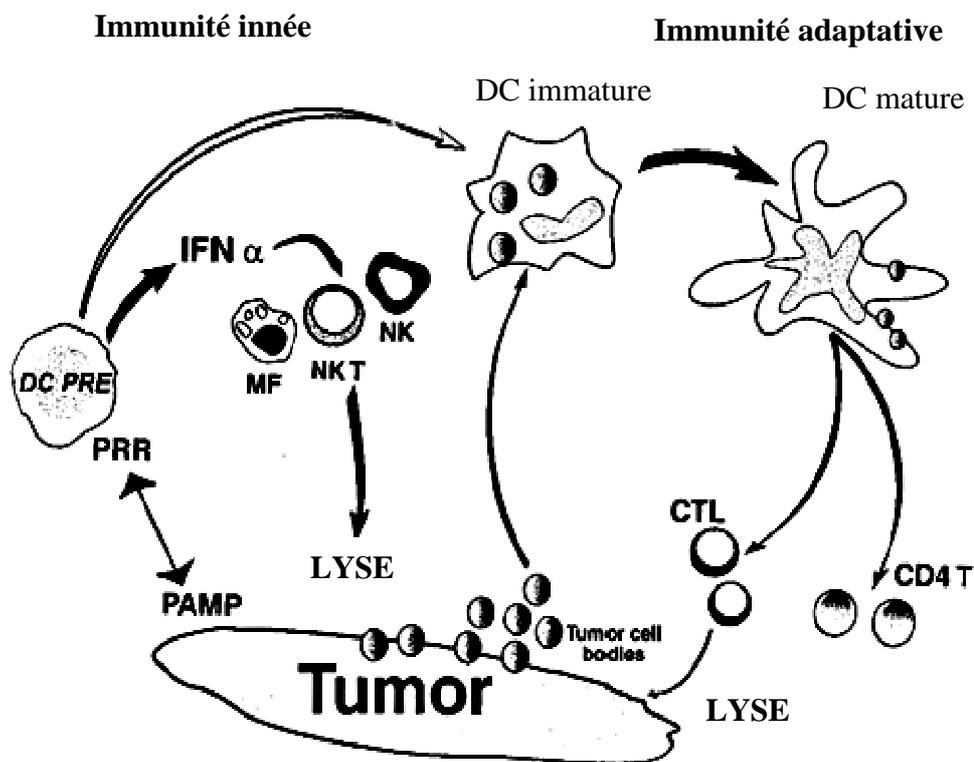
Les perforines et les granzymes sont des médiateurs contenus dans des granulations cytoplasmiques des lymphocytes T. Les granzymes sont des sérine-protéases qui sont délivrées à l'intérieur des cellules cibles par les pores préalablement créés par l'action des perforines. Une fois à l'intérieur de la cellule cible, les granzymes activent les caspases et induisent l'apoptose de la cellule cible.

Les lymphocytes T activés expriment Fas-ligand, une molécule homologue du TNF, capable de se lier au récepteur Fas, présent sur la cellule cible et

conduisant également à son apoptose, par l'intermédiaire de l'activation de la caspase 8.

## 2- Cellules dendritiques

Les progéniteurs de cellules dendritiques (DC) de la moelle osseuse donnent naissance à des précurseurs circulants qui se localisent ensuite dans les tissus où ils résident en tant que cellules immatures. Les DC sont présentes dans tous les tissus lymphoïdes. Lorsqu'elles rencontrent un pathogène, elles sécrètent de l'IFN $\alpha$  permettant d'activer les granulocytes éosinophiles, les macrophages et les cellules NK (Figure 19).



**Figure 19 : Importance des DC dans le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative lors de la réponse antitumorale.**

Les précurseurs des DC reconnaissent les motifs moléculaires associés aux éléments pathogènes tumoraux (PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns) grâce à des récepteurs spécifiques (PRR : Pattern Recognition Receptor). Il s'en suit une sécrétion d'IFN $\alpha$  activant les macrophages et les cellules NK qui induisent une mort des cellules tumorales, concourant à la libération de fragments de cellules tumorales. Ces fragments sont capturés par les DC immatures, qui subissent une maturation et présentent les antigènes à une sélection de lymphocytes spécifiques de tumeurs. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> procèdent alors directement à la lyse des cellules tumorales alors que les lymphocytes CD4<sup>+</sup> activent les macrophages et les cellules NK (d'après [11]).

Les DC sont les principales CPA permettant d'initier, d'amplifier et de réguler une réponse immunitaire T spécifique dirigée contre des antigènes. Les DC expriment un niveau élevé de molécule de CMH II, de CD11c (intégrine) et de molécules de costimulation (CD80, CD86). Trois catégories de DC conventionnelles ont été identifiées chez la souris. Les DC lymphoïdes (CD11c<sup>+</sup>, MHC-II<sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD86<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup>, CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>), myéloïdes (CD11c<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, MHC-II<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup>, CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>) et plasmacytoïdes (CD11c<sup>lo</sup>, CD45RA<sup>hi</sup>, CD11b<sup>-</sup>, MHCII<sup>lo</sup>, IL-3R<sup>hi</sup>, CD4<sup>+</sup>) [160, 225].

Les deux premières catégories de DC ont été mises en évidence dans la rate [143]. Les DC lymphoïdes orientent les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs vers la production de cytokines de type Th1, alors que les DC myéloïdes orientent les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> vers une réponse de type Th2 [11, 143]. Par conséquent, le GM-CSF, qui mobilise préférentiellement les DC myéloïdes chez la souris, provoque principalement la production d'IgG1 en réponse à des antigènes solubles, alors que le Flt3-L, qui mobilise à la fois les DC lymphoïdes et myéloïdes, occasionne la production d'anticorps de type IgG2a, une signature du type Th1. Les DC plasmacytoïdes, sont caractérisées par leur capacité à sécréter de l'IFN $\gamma$  [160, 225].

Les DC myéloïdes sécrètent de l'IL-12 et de l'IL-18 solubles stimulant la production d'IFN $\gamma$  promouvant la cytotoxicité et la prolifération des cellules NK [62]. Les travaux de Masurier démontrent que les cellules NK au repos peuvent être activées directement par contact avec des DC indépendamment de l'IL-12 ou des IFN $\alpha$  et  $\beta$ , plaçant les DC à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité acquise. L'activation des cellules NK par les DC se traduit notamment par une augmentation de la survie, de la fonction lytique et de la sécrétion d'IFN $\gamma$  [135].

### **3- Cellules NK (Natural Killer)**

#### **a- Caractéristiques des cellules NK**

Les cellules NK, cellules de l'immunité innée, ont été découvertes au début des années 70. Ces cellules représentent 10 à 15% des lymphocytes circulants et ne portent pas de TCR. Le développement des cellules NK se fait en trois phases

[54]. La première phase constitue l'engagement des cellules progénitrices hématopoïétiques dans la lignée NK. La seconde phase comprend l'acquisition des molécules impliquées dans la détection des cellules cibles (comme le NK1.1) par les cellules NK immatures. Enfin, la troisième phase concerne la différenciation finale des cellules afin d'acquies pleinement les compétences caractéristiques des cellules NK matures.

NK1.1, également nommé Nkrp1c, est un récepteur appartenant à la famille murine Nkrp1 présent chez différentes lignées de souris, comme les souris C57BL/6 et absent chez d'autres, notamment les souris Balb/c. Le marqueur NK1.1 est absent des précurseurs des cellules NK mais est exprimé par les NK immatures et matures. Le NK1.1 est un récepteur activateur dont le ligand est inconnu. La présence du NK1.1 associée à l'absence d'expression du marqueur CD3 est la combinaison utilisée en routine pour identifier les cellules NK en cytométrie de flux. Outre son rôle dans l'identification des cellules NK, un anticorps anti-NK1.1 peut être utilisé pour la déplétion *in vivo* des cellules NK chez la souris C57/BL6.

Morphologiquement, les cellules NK sont plus grosses que les lymphocytes et contiennent de nombreuses granulations azurophiles ; c'est pourquoi, elles sont fréquemment nommées grand lymphocytes granuleux. Elles font partie du système immunitaire inné et constituent souvent la première ligne de défense contre les infections virales et les tumeurs. En effet, les cellules NK ont la capacité de lyser une grande variété de cellules tumorales et de cellules infectées par des virus ainsi que de produire des cytokines et des chimiokines. Les cellules NK ont également la capacité de lyser les cellules recouvertes d'IgG par ADCC.

#### b- Activation des cellules NK

L'activation des cellules NK par des cytokines conduit à une augmentation de leur taille, de leur granularité et à l'expression de marqueurs de surface tels que le CD69 (lectine) ou encore le CD25 [8, 56]. Le CD69 appartient à la superfamille des lectines C et est une protéine membranaire constituée d'un homodimère lié par des ponts disulfures, possédant deux chaînes phosphorylées. Il est exprimé par les cellules NK activées et est un des marqueurs d'activation des cellules NK le plus précocement exprimé. Une étude de Giavedoni, révèle

une corrélation entre l'activité cytotoxique des cellules NK (sécrétion d'IFN $\gamma$ ) et l'expression du CD69 chez des macaques Rhésus [80].

c- NK et immunité antitumorale

Les cellules NK ont la capacité de lyser les cellules n'exprimant pas, ou peu, les molécules du CMH de classe I. En effet, les cellules NK possèdent des récepteurs inhibiteurs dont les ligands sont des molécules du CMH de classe I. En d'autres termes, toute cellule exprimant peu ou pas de molécules du CMH de classe I n'active pas les récepteurs inhibiteurs des cellules NK, et donc sera lysée (**Figure 20**). Chez la souris les principaux récepteurs inhibiteurs sont des lectines (Ly49 et CD94/NKG2A). Les cellules NK présentent également des récepteurs activateurs permettant la lyse des cellules tumorales exprimant les molécules du CMH de classe I et des ligands activateurs. Chez la souris, ces récepteurs activateurs sont également des lectines (Ly49D/H) (**Figure 21**).

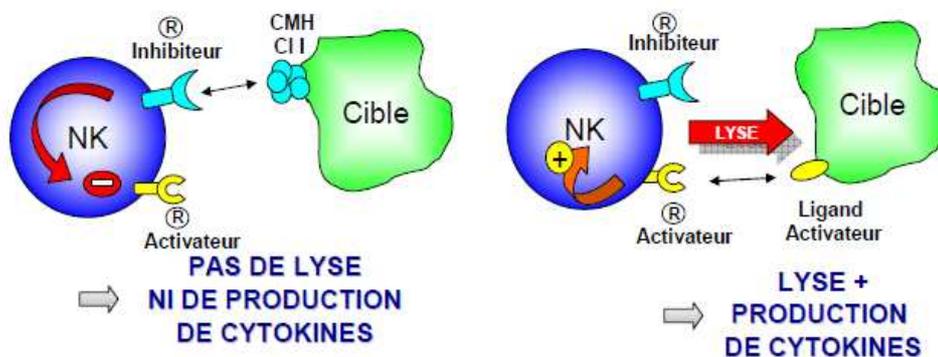


Figure 20 : Action des NK selon le niveau d'expression du CMH de classe I sur la cellule cible

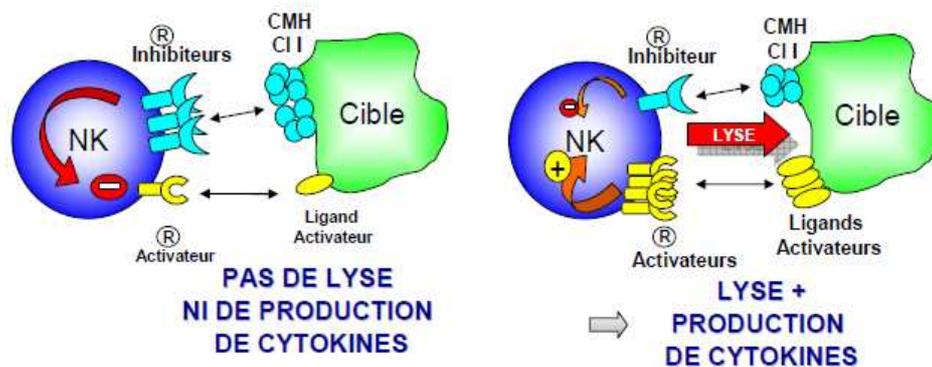


Figure 21 : Action des NK selon le niveau d'expression de ligands activateurs sur la cellule cible

Il s'agit d'une immunité sans stimulation préalable et non spécifique (les cellules NK ne possèdent pas de TCR). Leur mode d'action est proche de celui des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (sécrétion de perforine et de granzymes). Les cellules NK peuvent détruire des cibles tumorales recouvertes d'anticorps car elles expriment à leur surface le récepteur pour la fraction Fc des IgG (CD16).

Leur action est potentialisée par certaines cytokines comme les TNF ( $\alpha$  et  $\beta$ ), l'IL-2 (libérée par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>) ou encore l'IL-12 (secrétée par les macrophages). Les cellules NK n'ont pas de « mémoire » et semblent servir de premier mécanisme effecteur cellulaire contre les cellules tumorales [13]. Elles seraient donc des acteurs précoces dans la réponse immunitaire, confirmant la théorie de Janeway stipulant que l'immunité innée dicte l'immunité acquise [103]. Les cellules NK, recrutées aux sites tumoraux participent à la lyse des cellules tumorales et à la libération consécutive de débris cellulaires. Ces débris nécrotiques ou apoptotiques sont ensuite phagocytés et présentés par des CPA, induisant ainsi une réponse immunitaire lymphocytaire T spécifique des antigènes tumoraux [50].

Les travaux de Gerosa montrent une étroite collaboration entre les cellules NK et les DC. Lors d'expérience de co-culture de cellules NK et de DC issues de sang humain, il est observé une activation des cellules NK (augmentation de l'expression de CD69), une maturation des DC (augmentation de l'expression des molécules de costimulation CD80, CD83 et CD86) et une augmentation de la production d'IL-12. Les cellules NK activées par l'IL-2 induisent directement la maturation des DC et augmentent leur capacité à stimuler les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> [78].

## **B- Intérêt et rôle *in vivo* de Flt3-ligand**

Le Flt3 (Fms-like tyrosine kinase receptor 3) est un récepteur membranaire tyrosine kinase de type III, appartenant à la même famille de récepteur que les récepteurs KIT, FMS et PDGF. Sa liaison au Flt3-L, une glycoprotéine, stimule la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices hématopoïétiques, mais également la maturation des lymphocytes B, T et des cellules NK.

## **1- Cellules productrices de Flt3 ligand**

Bien que l'ARNm du Flt3-L soit exprimé de façon ubiquitaire par de nombreux tissus, la protéine n'est retrouvée qu'au sein des lymphocytes T et des fibroblastes du stroma de la moelle osseuse hématopoïétique [222, 223]. Le Flt3-L est exprimé en temps que protéine liée à la membrane à la surface des cellules et peut subir un clivage protéolytique, générant une protéine soluble. Ces deux isoformes, membranaire et soluble, exercent leur activité au niveau des membranes des cellules exprimant le récepteur au Flt3-L. Il est à noter que les Flt3-L murin et humain présentent une homologie de 72% dans leur séquence d'acides aminés [55]. Le gène codant est situé sur le chromosome 5 chez la souris et sur le chromosome 13 chez l'homme. Les souris déficientes en Flt3-L présentent une réduction significative du nombre des progéniteurs hématopoïétiques (myéloïdes et lymphoïdes). De plus, ces souris ont un nombre réduit de lymphocytes B, de cellules NK et de DC au niveau du thymus, du sang périphérique, des nœuds lymphatiques et de la rate [142]. Ces observations mettent clairement en évidence le rôle crucial du Flt3-L dans la genèse de ces cellules du système immunitaire.

## **2- Cellules cibles du Flt3 ligand**

Les récepteurs au Flt3-L murin et humain partagent 86% d'homologie. Chez la souris, le récepteur au Flt3-L est présent au niveau de la moelle osseuse, du cerveau, du thymus, de la rate et du foie fœtal [5]. Au niveau cellulaire, le récepteur au Flt3-L est présent sur les lymphocytes B, T, et les monocytes de la rate, du thymus et du sang. Au niveau de la moelle osseuse, il est présent sur les cellules blastiques, les monocytes et de rares lymphocytes (pré-pro B et pro-B). Les souris déficientes en récepteur au Flt3-L ne présentent pas d'altérations phénotypiques (lymphocytes B fonctionnels dans le sang) mais la capacité de leurs cellules hématopoïétiques au repeuplement après irradiation est fortement limitée [129]. En effet, ces souris présentent un nombre réduit de précurseurs de lymphocytes B (pro-lymphocytes B) dans la moelle osseuse hématopoïétique. En ce qui concerne les autres populations cellulaires, ces souris déficientes en récepteur au Flt3-L présentent :

- une réduction de la cellularité de la moelle osseuse hématopoïétique (-27%), des nœuds lymphatiques (-35%) et de la rate (-30%), touchant principalement les lymphocytes B et T,
- une diminution du nombre des DC CD11c<sup>+</sup> au sein de la rate (-11%), du thymus (-6%) et des nœuds lymphatiques (-6,5%),
- et une diminution du nombre de cellules NK dans la rate (-19%) [142].

En effet, Williams a démontré la nécessité du Flt3-L pour la génération *in vitro* de cellules NK à partir de cellules souches hématopoïétiques [222].

### 3- Effets cellulaires du Flt3 ligand

#### a- Effet sur les progéniteurs hématopoïétiques

Après traitement par le Flt3-L, une augmentation du nombre de cellules progénitrices hématopoïétiques a été rapportée [26]. Ces effets sont transitoires et un retour aux valeurs normales est atteint en une semaine suite à l'arrêt du traitement.

#### b- Effet sur les leucocytes sanguins

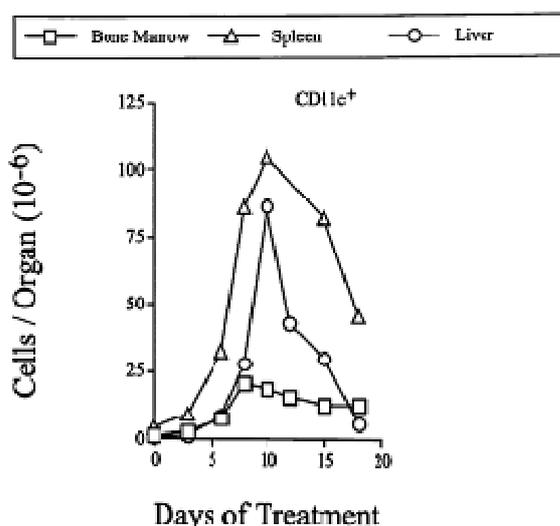
L'adjonction de Flt3-L à des souris saines engendre une augmentation des lymphocytes (x 3,4), des monocytes (x 77,5) et des granulocytes neutrophiles (x 9,8) dans le sang [26]. Smith a décrit dans une étude l'expansion des lymphocytes T *in vivo*, consécutive à un traitement par le Flt3-L [194]. Ces numérations-formules sanguines reviennent à la normale une semaine après la fin du traitement par le Flt3-L. Chez l'homme, l'administration de Flt3-L occasionne un doublement de la population lymphocytaire sanguine [133].

#### c- Effet sur les cellules dendritiques

Un traitement de 10 jours consécutifs chez la souris engendre une augmentation du nombre de DC CD11c<sup>+</sup> dans les tissus lymphoïdes (moelle osseuse hématopoïétique, rate (x 17), nœuds lymphatiques (x 4), thymus, tissu lymphoïde

gastro-intestinal) et non lymphoïdes (sang (x 6 à 10), foie, poumon, cavité péritonéale) [5, 131]. L'augmentation du nombre des DC CD11c<sup>+</sup> dans la rate atteint son maximum à 10 jours [191] (**Figure 22**). Le Flt3-L augmente le nombre de DC, qu'elles soient lymphoïdes ou myéloïdes [11]. Cependant l'effet immunitaire adjuvant du Flt3-L est abrogé chez les souris déficientes en DC plasmacytoïdes [115], ce qui souligne l'importance de ce type de DC dans la réponse immunitaire dépendante du Flt3-L.

Chez l'homme, l'administration de Flt3-L (25  $\mu$ g/kg pendant 14 jours) occasionne une augmentation des DC CD11c<sup>+</sup>. Cependant, ces DC ne sont que partiellement activées : elles expriment des niveaux élevés de CD86 et de CMH de classe II mais de faibles niveaux de CD80 et de CD83 (molécules d'activation) [133].



**Figure 22 : Cinétique des variations numériques induites par un traitement de 10 jours consécutifs avec 10  $\mu$ g de Flt3-L/injection sur les DC dans différents organes chez la souris (D'après [191]).**

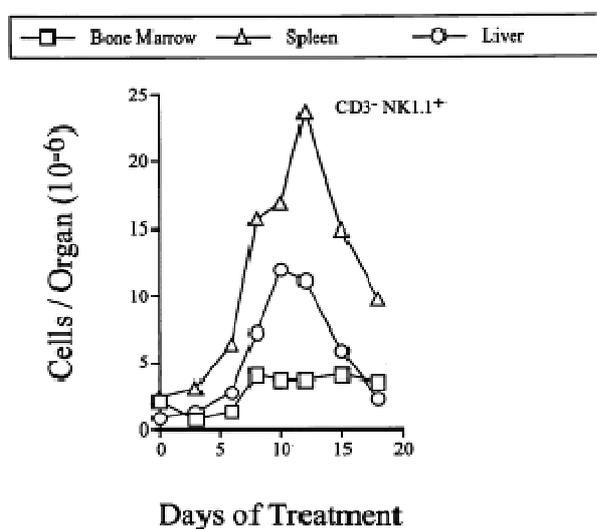
#### d- Effet sur les cellules NK

Les souris déficientes en Flt3-L présentent une diminution du nombre de cellules NK matures dans la rate, suggérant un impact direct du Flt3-L sur le développement des cellules NK [142]. Le Flt3-L possède la capacité de promouvoir la prolifération des cellules NK, notamment par la présence du récepteur Flt3 sur les précurseurs des cellules NK [55]. L'administration de Flt3-L à des souris en IP (10  $\mu$ g/j pendant 10 jours) conduit à une augmentation

notable à la fois du nombre absolu, de la proportion et de l'activité lytique des cellules NK dans le foie, la moelle osseuse hématopoïétique, la rate, le sang et le thymus [26, 191] (**Tableau XIV**) (**Figure 23**).

**Tableau XIV : Modification du nombre absolu, des proportions et de l'activité des cellules NK (CD3<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup>) suite à 10 jours de traitement par le Flt3-L (10  $\mu$ g/j) chez la souris (D'après [191]).**

	Moelle osseuse	Thymus	Sang	Rate	Foie
Nombre absolu	x1.8 (pic à J8 x 2)	x2	x10.7	x6.8 (pic à J12 x10)	x14.9 (pic à J10)
Proportion	x1.6	x2.8	x2.4	x2	x1.6
Activité cytolytique	x2.2	ND	x15.1	x5.5	x18.4



**Figure 23 : Cinétique des variations numériques induites par un traitement de 10 jours consécutifs avec 10  $\mu$ g de Flt3-L/injection sur les cellules NK dans différents organes chez la souris (D'après [191]).**

Cependant les cellules NK matures ne possèdent pas de récepteur au Flt3-L et ne peuvent être activées directement par le Flt3-L [191]. Il peut donc être envisagé un mode d'action du Flt3-L sur les cellules NK en deux temps. Dans un premier temps, le Flt3-L stimule la prolifération et la différenciation de précurseurs hématopoïétiques, notamment de la lignée monocyttaire, aboutissant à une augmentation du nombre de DC, dans la rate principalement. Ces DC produisent des cytokines (IL-15, IL-12, IL-18, IFN $\gamma$ ) à l'origine de la promotion de la prolifération et de la cytotoxicité des cellules NK [62, 68, 142, 191]. Cette hypothèse est fortement étayée par l'étude de Guimond chez la souris qui démontre, suite au traitement par le Flt3-L, une expansion des cellules CD11c<sup>+</sup>

dans un premier temps, suivie d'une expansion des cellules NK1.1<sup>+</sup> dans un deuxième temps [86]. Cette expansion des cellules NK1.1<sup>+</sup> est abrogée chez les souris déficientes en CD11c<sup>+</sup> et en IL-15, supportant donc l'hypothèse selon laquelle une coopération existe entre DC CD11c<sup>+</sup> et cellules NK, passant par l'IL-15.

#### **4- Flt3 ligand et myélotoxicité**

Les individus sains présentent des faible taux de Flt3-L plasmatique (113 à 134 pg/ml). Cependant, il est à noter que ce taux augmente (jusqu'à 1000 pg/ml) lors de désordres hématopoïétiques affectant le compartiment des cellules souches (pancytopénie), notamment lors de la phase de récupération suivant une chimiothérapie ou une greffe de moelle osseuse [97]. C'est également le cas lors de l'anémie de Fanconi, d'anémies aplasiques acquises, et lors d'irradiation externe [223]. Les variations de la concentration plasmatique de Flt3-L sont directement corrélées à la fois à la dose d'irradiation et au volume irradié chez la souris [198] comme chez l'homme [97]. De plus, l'augmentation de la concentration sérique en Flt3-L corrèle avec la diminution du nombre de leucocytes et de thrombocytes sanguins [97]. Le Flt3-L est un excellent bio-indicateur diagnostique : l'augmentation de sa concentration plasmatique est spécifique de l'atteinte de la moelle osseuse et permet une évaluation précise de l'hématopoïèse résiduelle de la personne irradiée. Il est également un bio-indicateur à visée pronostique ; en effet, le suivi de la concentration de Flt3-L durant la première semaine après irradiation permet de prédire la durée et la sévérité de l'aplasie, et donc l'évolution clinique de la personne irradiée [97].

#### **5- Effet antitumoral du Flt3 ligand**

L'administration systémique de Flt3-L démontre une certaine efficacité dans la réduction de la croissance tumorale et l'induction d'une infiltration mixte de la tumeur (DC et lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques). Cet effet antitumoral du Flt3-L s'avère dose-dépendant [128]. Le Flt3-L augmente le taux de survie et diminue les métastases pulmonaires chez les souris greffées (cancer mammaire syngénique) [38] (**Tableau XV**).

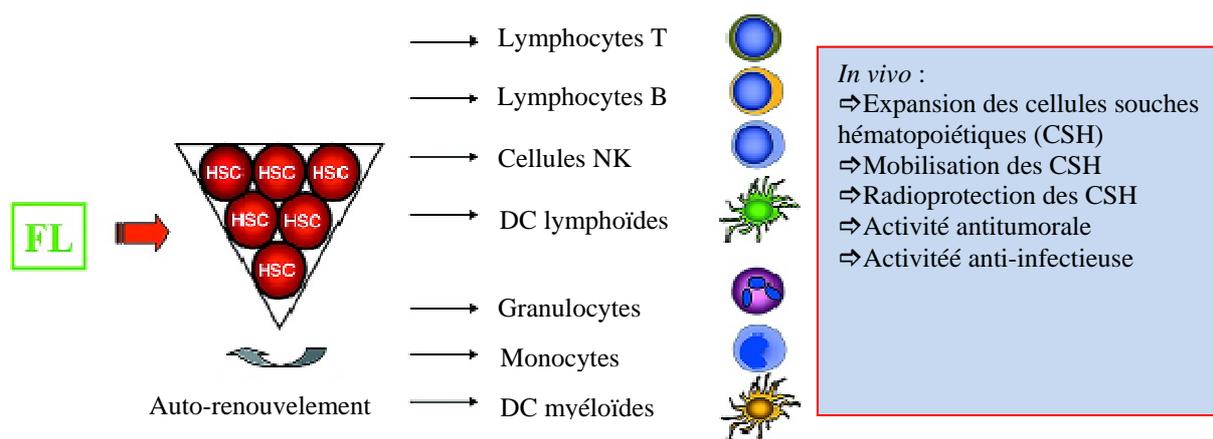
Tableau XV : Activité antitumorale du Flt3-L dans les modèles murins

Modèle	Effet du Flt3L	Référence
Mélanomes syngéniques (CL8-1, B16)	Diminution de la croissance tumorale Augmentation du nombre de DC intratumorales (B16)	[65]
Lymphome syngénique (EL-4)	Diminution de la croissance tumorale Augmentation du nombre de DC intratumorales	[65]
Adénocarcinome prostatique syngénique (TRAMP-C1)	Suppression de la croissance tumorale et stabilisation des tumeurs Infiltration macrophagique de la tumeur	[41]
Fibrosarcome induit au méthylchloranthrène	Régression complète (19 souris sur 50) Diminution de la croissance tumorale chez des souris immunocompétentes (31 souris sur 50) et chez des souris SCID Effet antitumoral amoindri si déplétion en lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> ou irradiation	[128]
Métastases hépatiques de sarcome (C3) et d'adénocarcinome colique (MC38) syngéniques	Réduction des métastases hépatiques Augmentation du nombre de DC et de lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup> intratumoraux Effet antitumoral diminué si déplétion en cellules NK	[167]
Métastases pulmonaires de carcinome pulmonaire syngénique (3LL/D22)	Diminution de la croissance tumorale Augmentation du temps de survie (en combinaison avec une radiothérapie X locale) Effet antitumoral non observé chez les souris Nude	[36]
Cancer mammaire syngénique (C3L5)	Régression complète mais transitoire Absence de réponse mémoire (pas de survie des souris après ré-administration)	[38]
Carcinome ovarien (xénogreffe)	Diminution de la croissance tumorale chez les souris SCID Effet antitumoral abrogé si déplétion en cellules NK	[193]
Mésothéliome (AK7)	Diminution de la croissance tumorale Effet antitumoral abrogé si déplétion en cellules NK (souris B6-beige, déplétion NK)	[68]

Cette activité antitumorale du Flt3-L est également rapportée dans le mélanome [65], le lymphome [65], les carcinomes pulmonaire [36] et ovarien [193] les adénocarcinomes prostatique [41] et colique [67] ainsi que dans le mésothéliome [135]. Fernandez a montré que l'administration du Flt3-L, chez des souris greffées avec des cellules de mésothéliome murin (AK7, négatives pour le CMH de classe I), induit une diminution de la croissance tumorale. Cette régression cesse dès l'arrêt du traitement. Cet effet antitumoral est aboli chez des souris beige (déficiences pour la fonction NK) et chez des souris immunocompétentes déplétées en cellules NK par un anticorps anti-NK1.1 [68]. De nombreuses autres études décrivent l'abrogation de l'effet antitumoral du Flt3-L lors de déplétions des NK chez la souris [36, 68, 167, 193].

Cependant, il est également rapporté une abrogation de l'effet antitumoral du Flt3-L chez des souris déplétées en lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. L'effet antitumoral du Flt3-L est également démontré chez les souris SCID immunodéficientes, suggérant l'implication de mécanismes indépendants des lymphocytes dans la régression tumorale induite par le Flt3-L [128].

Les différentes activités biologiques du Flt3-L, aussi bien *in vivo* que *in vitro*, sont décrites **Figure 24**. L'administration de Flt3-L seul chez l'homme n'est, en revanche, suivie d'aucun effet antitumoral significatif, bien qu'elle soit à l'origine d'une augmentation du nombre DC CD11c<sup>+</sup> circulantes (x 44) [133].



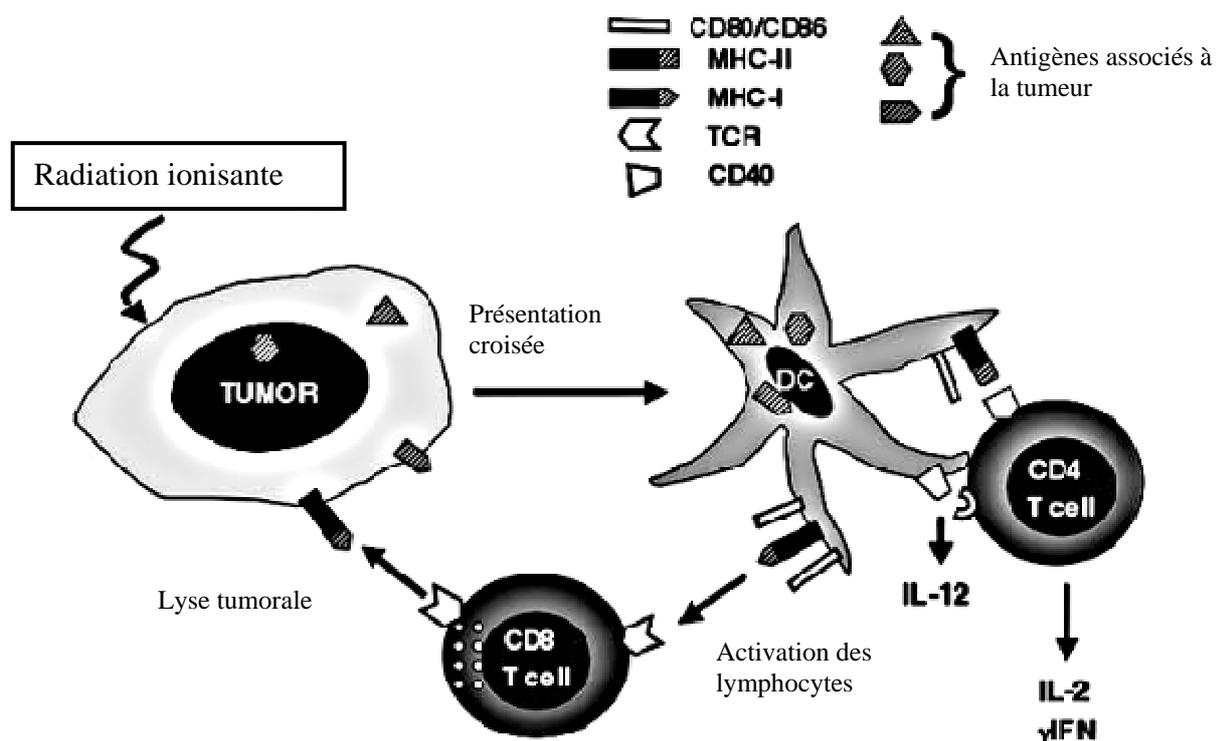
**Figure 24 : Activités biologiques du Flt3-L *in vivo***

L'adjonction de Flt3-L (FL) stimule l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques ainsi que la mobilisation des cellules matures issues de la différenciation de des cellules souches (D'après [224]).

## 6- Flt3- ligand et effet abscopal

Dans le cas de la radiothérapie, plusieurs études se sont penchées sur les mécanismes de l'effet abscopal. Il a notamment été montré, dans un modèle de carcinome pulmonaire murin très métastatique, que l'administration de Flt3-L après irradiation à forte dose (60 Gy) permettait de réduire le nombre de métastases pulmonaires et d'accroître significativement la survie des souris.

La combinaison de la radiothérapie et du traitement par le Flt3-L s'avère plus efficace que l'un ou l'autre des traitements seuls [36]. Cet effet bénéfique n'est pas observé chez les souris Nude (athymiques) indiquant que les lymphocytes T sont, du moins en partie, responsables de la réduction des métastases et de l'augmentation de la survie. De récentes études montrent que la radiothérapie associée à un traitement par le Flt3-L peut réduire la croissance d'une tumeur implantée à distance du champ d'irradiation (**Figure 25**).



**Figure 25 : Modélisation du rôle des radiations ionisantes dans la promotion de la présentation croisée des antigènes associés à la tumeur et dans l'activation des lymphocytes T antitumoraux**

La présence de « signaux danger » adéquats, induit la maturation de DC, l'activation des lymphocytes T spécifiques et la production de cytokines pro-inflammatoires. Les lymphocytes acquièrent ainsi la capacité à lyser les cellules tumorales (d'après [51]).

Cet effet abscopal est de nature immunologique puisqu'exercé par des lymphocytes T spécifiques de tumeur [50]. Le mécanisme supposé est le suivant : les rayonnements ionisants induisent une inflammation locale des tissus, l'expression de protéines de stress (HSP : Heat Shock Protein) ou de la calréticuline (protéine chaperonne du réticulum endoplasmique), et la production de débris cellulaires tumoraux phagocytés par des CPA. Ce microenvironnement génère des signaux dits de « danger » (ou DAMP pour Danger Associated Molecular Pattern) qui permettent la maturation des DC indispensables à la présentation des antigènes tumoraux aux lymphocytes T et à l'activation d'une réponse spécifique [53, 139]. La nature du signal danger conditionne l'efficacité et l'amplitude de la réponse adaptative. Jusqu'à présent, l'effet abscopal a été observé chez l'animal suite à une irradiation externe à l'aide de rayonnements  $\beta$  et  $\gamma$ , mais à ce jour, aucune évidence de l'existence d'un effet abscopal après irradiation interne, en particulier alpha, n'a été décrite.

Un autre mécanisme peut être à l'origine de cet effet abscopal, impliquant directement les lymphocytes T. En effet, les rayonnements ionisants peuvent sensibiliser des cellules tumorales à l'action du système immunitaire. Les cellules tumorales présentent, en général, une faible expression des molécules du CMH de classe I à leur surface, ce qui leur permet d'échapper aux lymphocytes T cytotoxiques. Or, les radiations ionisantes induisent une augmentation du niveau d'expression des molécules du CMH de classe I, rendant ainsi les cellules plus vulnérables aux attaques de ces lymphocytes T.

Les travaux de Demaria, portant sur un modèle de carcinome mammaire chez la souris, démontrent également l'existence d'un effet abscopal lors de l'association RIT et traitement par le Flt3-L. Il y est reporté la spécificité tumorale de cet effet abscopal ainsi que sa médiation par les lymphocytes T (effet abscopal inexistant chez les souris Nude) (**Figure 26**), et ce, après une dose faible d'irradiation (2 Gy) [50].

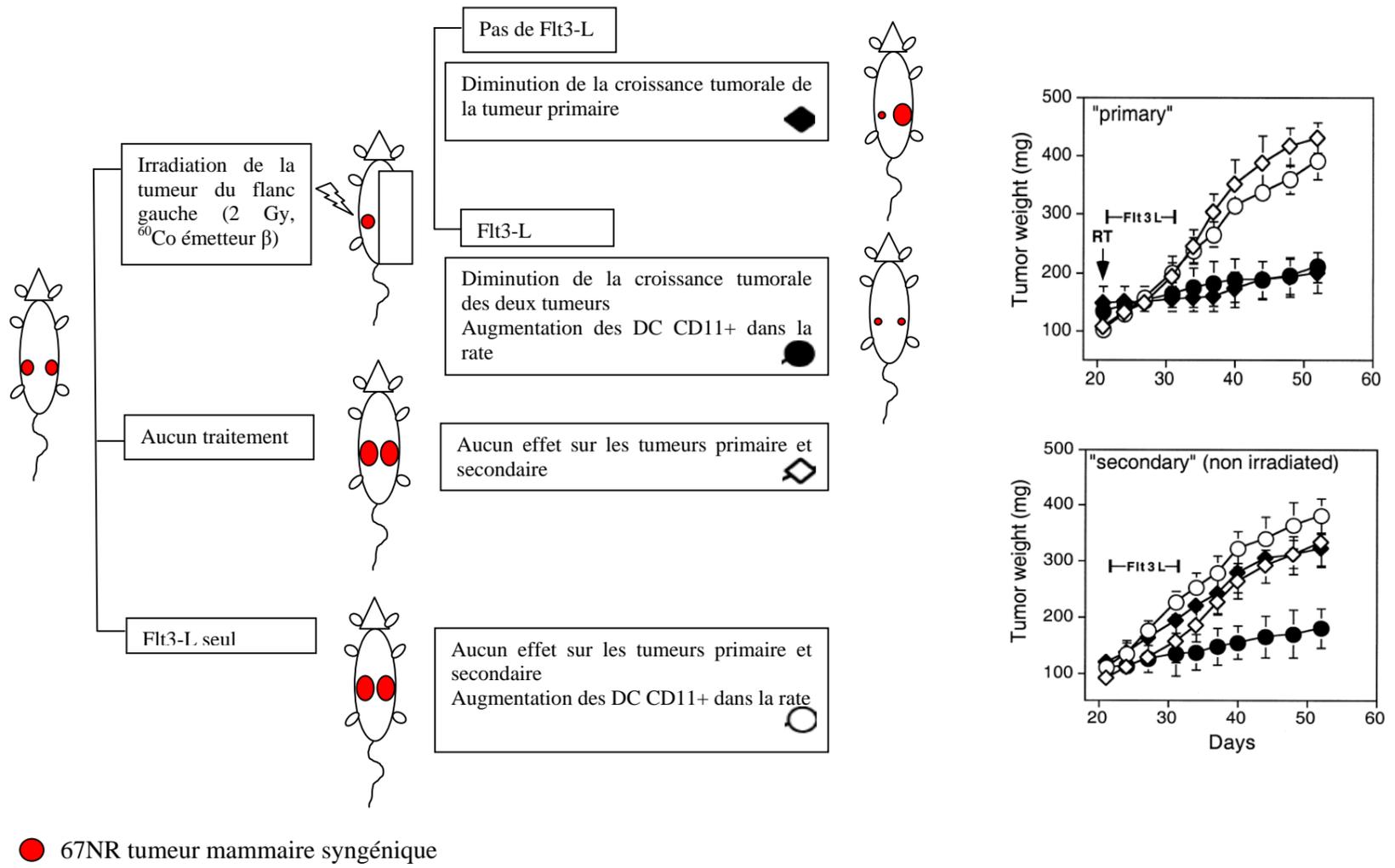


Figure 26 : Mise en évidence d'un effet abscopal spécifique suite au traitement conjugué RIT + Flt3-L

## II- Étude expérimentale : potentialisation de l'effet de la radioimmunothérapie alpha grâce à l'immunostimulation par le Flt3-ligand, étude dans un modèle murin de myélome multiple

### A- Le myélome multiple chez l'homme

Le myélome multiple est une tumeur d'origine plasmocytaire, représentant 1% des tumeurs chez l'homme et 10% des hémopathies malignes [14]. Son incidence aux États-Unis atteint 4,3 personnes sur 100 000 [120]. Le myélome multiple est caractérisé, chez l'homme, par la présence de cellules tumorales dans la moelle osseuse, la présence d'immunoglobulines monoclonales dans le sérum et l'urine et le développement de lésions osseuses de type ostéolytique caractéristiques. Chez l'homme, le traitement du myélome multiple se déroule en différentes phases pour les patients, en fonction de leur caractère éligible ou non à la greffe de moelle osseuse (**Figure 27**).

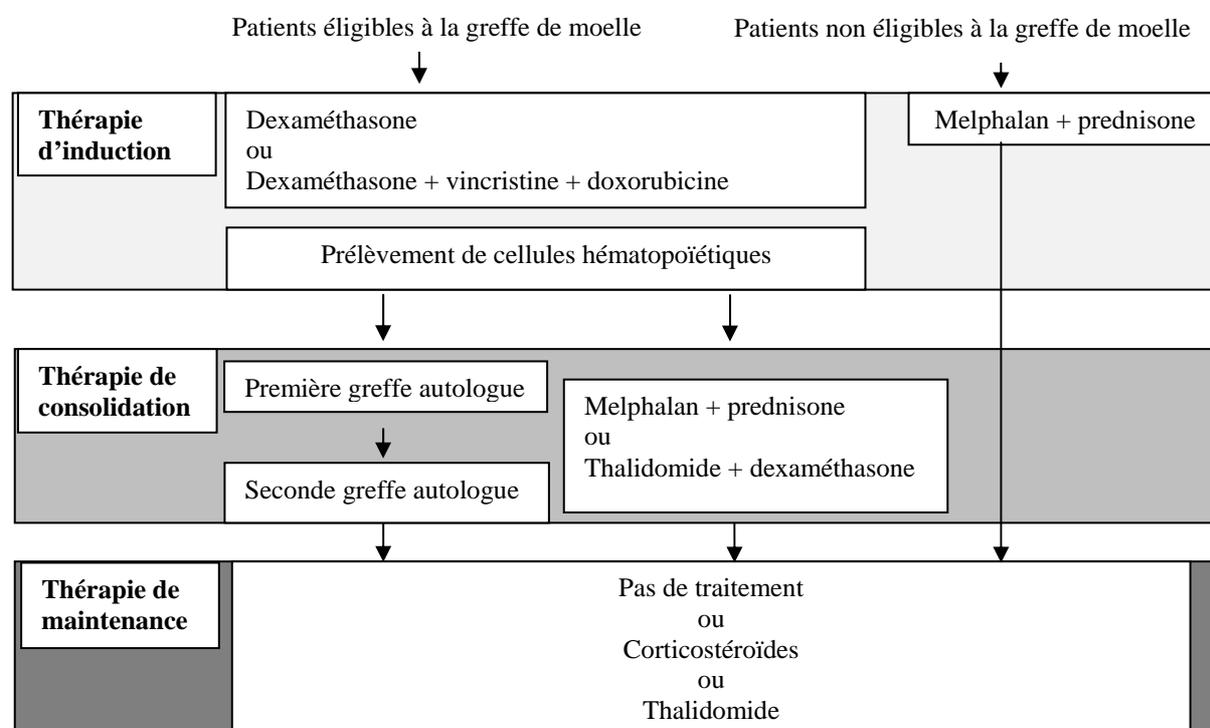
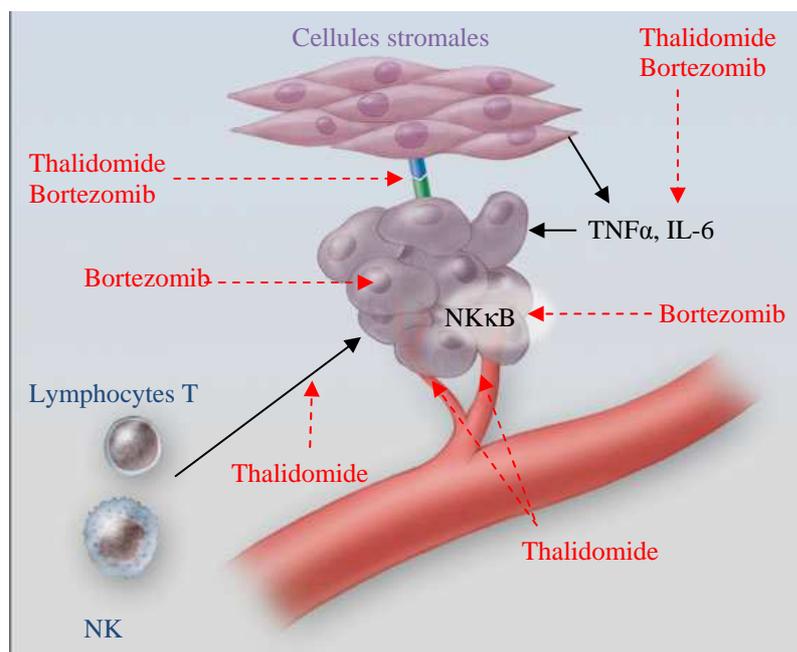


Figure 27 : Schéma thérapeutique du myélome multiple chez l'homme (D'après [119]).

De nouvelles molécules sont apparues sur le marché (en 2006 pour le thalidomide, en 2008 pour le bortezomib) dont l'indication principale est le traitement du myélome multiple. Le thalidomide agirait par différents mécanismes, non encore tous connus, parmi lesquels la suppression de l'angiogénèse, l'augmentation de cytotoxicité cellulaire et l'altération de l'expression des molécules d'adhésion [119]. Le bortezomib est un inhibiteur du protéasome, agissant notamment sur la voie  $\text{NK}\kappa\text{B}$ . Leur mécanisme d'action est développé ci-dessous (**Figure 28**).



**Figure 28 : Mécanismes d'action du thalidomide et du bortezomib dans le cadre du traitement du myélome multiple chez l'homme**  
(D'après [119]).

### **B- Modèle de myélome multiple syngénique et immunocompétent : injection de cellules 5T33 chez les souris KaLwRij**

La souche KaLwRij est une souche de souris de base C57BL/6, immunocompétente, caractérisée par le développement spontané d'un myélome multiple, pouvant atteindre une fréquence de 0.5% à 2 ans [171]. La lignée cellulaire 5T33 est issue de la série des lignées myéломateuses de souris 5T. Cette lignée nous a été fournie gracieusement par le Dr Harvey Turner (Department of Nuclear Medicine, Fremantle Hospital) avec la permission du Dr Jiri Radl (TNO Institute). En culture, ces cellules croissent en suspension et

présentent un temps de doublement maximum de 25 heures. Ces cellules sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Gibco), 10% SVF (Sérum de Veau Fœtal) (PAA Laboratories/GE Healthcare Europe GmbH), 2 mM glutamine, 100 U/ml pénicilline, 0,1 mg/ml streptomycine et incubées à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> et 95% d'humidité. L'injection intraveineuse d'un million de 5T33 aboutit au développement du myélome multiple et à la mort des souris en 45 à 50 jours post inoculation [130].

Cependant, il est important de préciser que dans ce modèle, les lésions de type ostéolytiques ne sont pas rapportées, contrairement à l'évolution du myélome multiple chez l'homme (**Tableau XVI**) [3].

**Tableau XVI : Caractéristiques épidémiologiques et phénotypiques du myélome chez l'homme et la souris (D'après [171]).**

	<b>Homme</b>	<b>5T primaire de souris</b>	<b>5T33 modèle murin</b>
<b>Origine spontanée</b>	Oui	Oui	Non
<b>Fréquence liée à l'âge</b>	Oui	Oui	Non
<b>Localisation primaire à la moelle osseuse</b>	Oui	Oui	Oui
<b>Prolifération monoclonale progressive</b>	Oui	Oui	Oui
<b>Lésions osseuses ostéolytiques</b>	Fréquentes	Fréquentes	Absentes

Lors de l'apparition de la parésie postérieure, les cellules 5T33 sont détectables dans la moelle osseuse, la rate, le foie et dans les nœuds lymphatiques. La sévérité de la parésie postérieure est directement liée à la sévérité de l'infiltration de la moelle osseuse par les cellules myélomateuses [3].

L'avantage principal de ce modèle, outre sa concordance phénotypique et évolutive avec le myélome humain, est qu'il est syngénique et immunocompétent, donc parfaitement adapté à l'étude de la réaction immunitaire antitumorale.

## **C- Matériel et méthodes**

L'évaluation de la potentialisation de l'effet de la RIT alpha grâce à l'immunostimulation du Flt3-ligand va être conduite dans un modèle murin syngénique et immunocompétent de myélome multiple, induit par l'injection intraveineuse de cellules 5T33 (lignée de myélome multiple murin) chez des souris de souche KaLwRij. Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à

caractériser histologiquement et immunohistochimiquement les lésions observées chez les souris greffées avec des cellules 5T33. Dans un deuxième temps, nous avons déterminé les effets *in vivo* du Flt3-L que nous avons produit et nous avons effectué des expériences de RIT alpha, utilisant un anticorps anti-CD138 murin couplé au  $^{213}\text{Bi}$ , avec ou sans association avec le Flt3-L. Le CD138 (ou syndecan-1) fait partie de la famille des protéoglycanes membranaires porteurs de chaînes héparane-sulfates. Localisé au niveau de la membrane plasmique des cellules myélomateuses, le CD138 régit de nombreux processus biologiques tels que les interactions cellule-cellule (adhésion), cellule-matrice (migration), la prolifération et la différenciation cellulaires [181, 208, 220]. Cette molécule présente donc un réel intérêt thérapeutique et peut être considérée comme une cible pharmacologique. Afin d'identifier les populations cellulaires effectrices à l'origine de l'action antitumorale du Flt3-L dans le cadre de la RIT alpha, nous avons produit, dans un troisième temps, des anticorps déplétant sélectivement les cellules NK, les lymphocytes T  $\text{CD8}^+$  et les lymphocytes T  $\text{CD4}^+$ . Après avoir évalué l'efficacité de nos protocoles de déplétions, nous avons effectué une RIT alpha avec le  $^{213}\text{Bi}$ -CD138, avec ou sans traitement avec le Flt3-L et avec des anticorps déplétant sélectivement les principales cellules effectrices du système immunitaire.

### **1- Caractérisation histologique et immunohistochimique des lésions observées chez les souris greffées avec des cellules 5T33**

Afin de caractériser ces lésions, 51 souris KaLwRij sont injectées en intraveineuse avec  $10^6$  de cellules 5T33. Les souris sont sacrifiées pour raisons éthiques dès lors qu'elles présentent une perte de poids supérieure à 20% ou une paralysie des membres postérieurs, réduisant leur mobilité. Elles sont ensuite autopsiées et une première analyse macroscopique est réalisée. Le foie, la rate, les reins et les nœuds lymphatiques hypertrophiques sont prélevés et fixés dans une solution de formol 4%, tamponné à pH 7. Les organes sont ensuite inclus en paraffine et les blocs obtenus sont coupés au microtome, en section de 3  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Les sections obtenues sont colorées selon le procédé décrit dans le **tableau XVII** et sont ensuite observées au microscope.

Ces lames sont également utilisées pour détecter la présence de l'antigène CD138 par immunohistochimie. Pour cela, les lames sont colorées grâce un automate

(Benchmark XT, Ventana, Roche Diagnostics France, Meylan, France), en utilisant le système de révélation Ventana I-view. Le protocole utilisé est détaillé **tableau XVIII**.

**Tableau XVII : Coloration par l'Hemalun-Éosine-Safran (HES)**

Déparaffinage : méthylcyclohexane (Prolabo, 25 505.366)	2 x 10 minutes
Déparaffinage : alcool 100° (Carlo Erba, 52-9131)	2 passages
Déparaffinage : alcool 90°	1 passage
Réhydratation : alcool 85°	1 passage
Réhydratation : eau courante	1 passage
Colorer par l'hémalun (Sigma, H3136)	5 minutes
Différenciation : alcool chlorhydrique	1 passage
Différenciation : eau courante	1 passage
Différenciation : carbonate de lithium	1 passage
Laver à l'eau courante délicatement	10 minutes
Colorer par l'éosine (Sigma, E6003)	3 minutes
Laver à l'eau courante délicatement	
Déshydrater dans l'alcool 95° (Carlo Erba, 52-9131)	1 passage
Déshydrater dans l'alcool 100° (Carlo Erba, 52-9131)	2 passages
Colorer par le safran (Labonord, 115-07737)	2 minutes
Rincer dans l'alcool 100°	3 passages
Éclaircir dans le méthylcyclohexane	3 passages
Monter à l'Eukitt (Shandon, 19 00 333)	

**Tableau XVIII : Protocole d'IHC anti-CD138 murin**

	<b>Anticorps primaire</b>	<b>Anticorps secondaire</b>
<b>Spécificité</b>	Syndecan-1 : cellules épithéliales, plasmocytes	Immunoglobulines de rat
<b>Type d'anticorps</b>	Monoclonal de rat	Polyclonal de chèvre biotinylé
<b>Isotype</b>	IgG2ak	
<b>Clone</b>	281-2	
<b>Référence</b>	BD Pharmingen, ref.553712	Invitrogen, ref. 629540
<b>Dilution</b>	1 :100	1:200

## 2- Production du Flt3-ligand

Le Flt3-L murin sous forme soluble est produit en système eucaryote, afin d'éviter toute contamination d'origine bactérienne (notamment la présence d'endotoxines) (**Figure 29**). Le système utilisé comprend des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) transfectées avec le gène codant pour le Flt3-L murin (vecteur pKCR6), sélectionnées par le méthotrexate. Ces cellules sont cultivées

dans du RPMI 1640, 10% SVF, 2 mM glutamine, 100 U/ml pénicilline, 0,1 mg/ml streptomycine jusqu'à 70% de confluence. Ensuite, le milieu est remplacé par du milieu ProCHO4 et les cellules sont maintenues environ une semaine dans ce milieu. Le surnageant de culture est ensuite récupéré et filtré stérilement sur des membranes de 0.22  $\mu$ m.

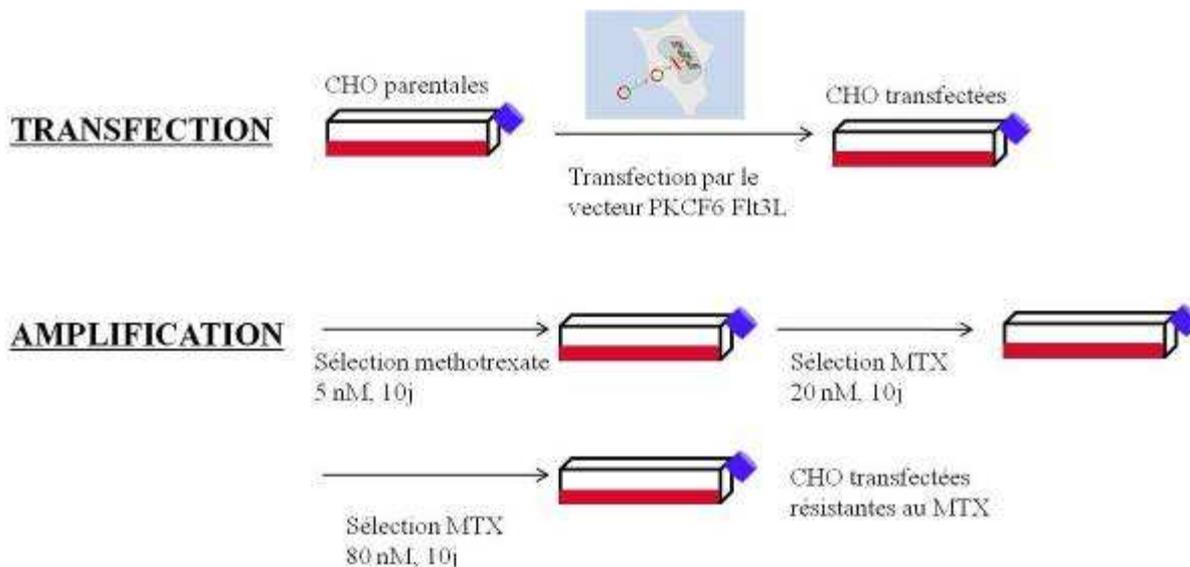


Figure 29 : Production du Flt3-L en système eucaryote (CHO)

#### a- Purification du Flt3 ligand

La purification du Flt3-L, se fait en trois étapes successives : ultrafiltration sous pression d'azote, passage sur une colonne échangeuse d'anion puis passage sur une colonne phase inverse (Figure 30).

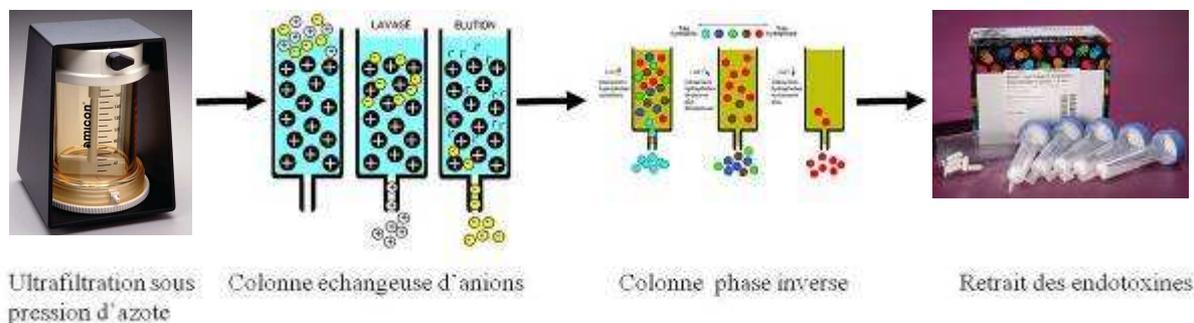


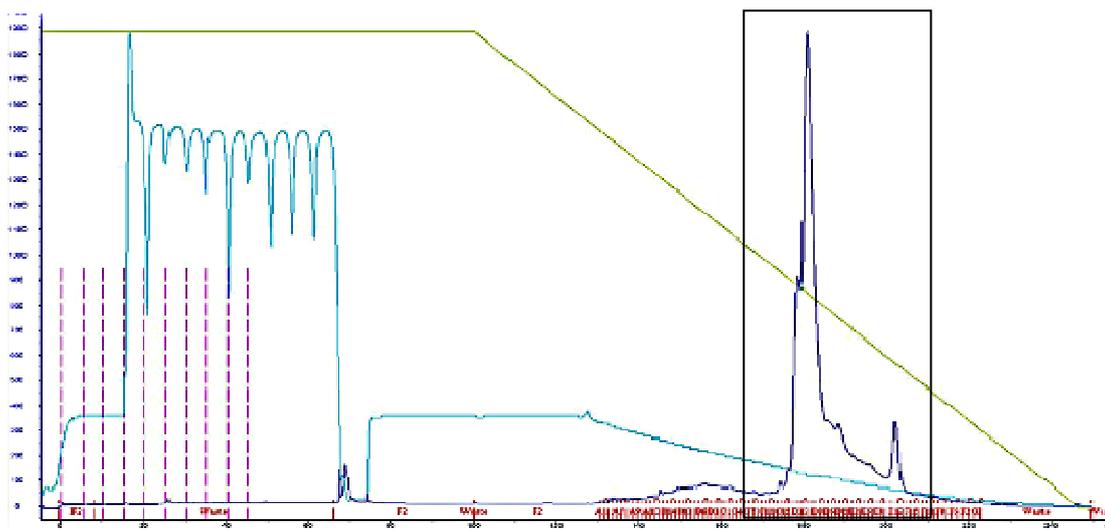
Figure 30 : Différentes étapes de purification du Flt3-L

L'ultrafiltration sous pression d'azote du surnageant de culture s'effectue grâce à une cellule de filtration frontale Amicon® de 400 mL (Stirred Cell 8400, Millipore, Molsheim, France) pourvue d'une membrane 30 kDa (Ultracel Ultrafiltration Disc, Millipore, Molsheim, France) avec du tampon Tris 20 mM pH 7.5. Le Flt3-L est quantifié par un dosage ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) spécifique (Mouse Flt3-L DuoSet®, R&D systems, Minneapolis, USA). Pas ou très peu de Flt3-L est détecté dans les filtrats et les lavages de concentration. Les surnageants concentrés sont congelés à -80°C en attente de purification.

La deuxième étape consiste en la purification sur colonne échangeuse d'ions MonoQ HR 16/10 (GE Healthcare). Cette méthode de chromatographie en phase liquide est basée sur la séparation des protéines selon leur charge. Le tampon d'équilibration utilisé est du Tris 20 mM pH 7.5 et le tampon d'éluion, du Tris 20 mM pH 7.5 + NaCl 1 M. Un dosage ELISA spécifique du Flt3-L est réalisé sur les fractions récoltées.

La troisième étape est constituée d'un passage sur une colonne phase inverse Nucleosil® 300-5C<sub>18</sub> (Marcherey-Nagel, Hoerd, France). Cette méthode est basée sur la séparation des protéines selon leur hydrophobicité (**Figure 31**). Un dosage ELISA spécifique du Flt3-L est réalisé sur les fractions récoltées.

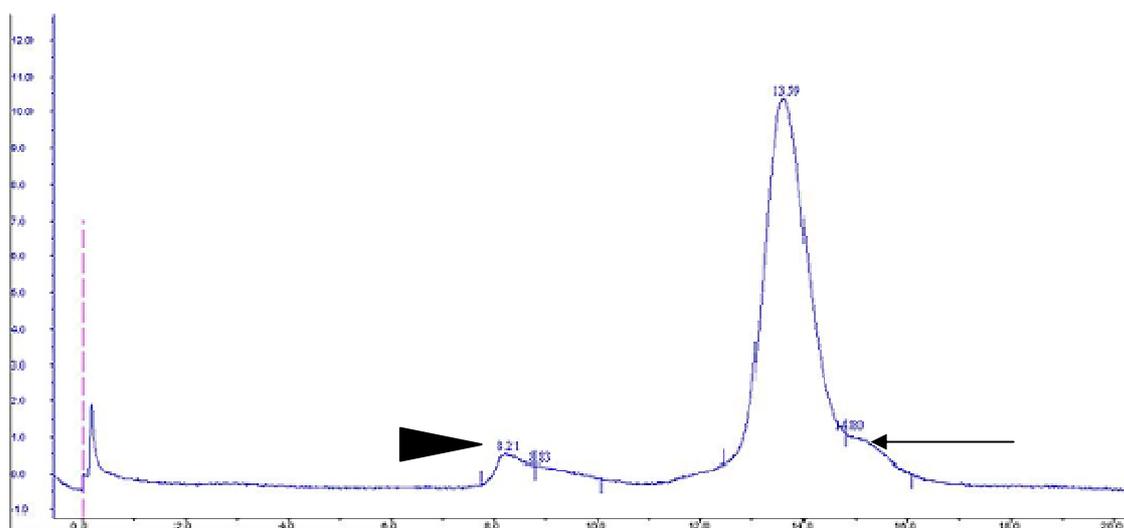
L'ultime étape consiste en l'élimination des endotoxines par colonne d'affinité (Pierce © High-Capacity Endotoxin Removal Resin, Thermoscientific) suivie du conditionnement stérile du Flt3-L produit. Un test de quantification des endotoxines est ensuite réalisé, pour contrôle, grâce à un kit de dosage enzymatique (Pierce© LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit, Thermoscientific).



**Figure 31 : Résultat après passage sur la colonne phase inverse**  
Le pic majoritaire indique les fractions contenant le Flt3-L, qui seront récoltées

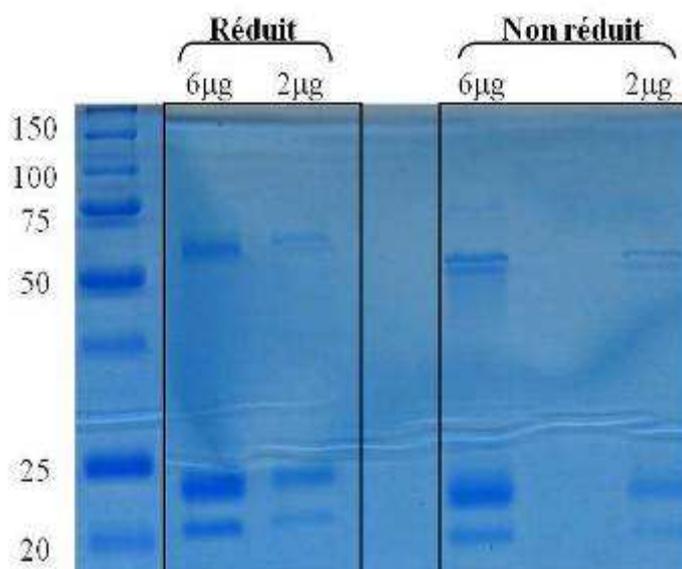
#### b- Contrôle qualité du Flt3 ligand

Le contrôle de pureté du Flt3-L est réalisé selon deux méthodes. La première consiste en l'utilisation d'une colonne de gel filtration S200 (GE Healthcare) afin d'effectuer une chromatographie et de séparer les différentes protéines selon leur taille (**Figure 32**).



**Figure 32 : Contrôle de pureté du Flt3-L sur colonne S200**  
Le pic majoritaire, obtenu à 13,59 mL correspond à la forme majoritaire trimérique de Flt3-L. La présence d'un épaulement (flèche) correspond à la forme monomérique de Flt3-L. Les agrégats sont présents en faible quantité (pointe de flèche) (6%)

La deuxième méthode consiste en la réalisation d'un SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) : 2 ou 6  $\mu$ g de Flt3-L murin purifié sont déposés en condition réductrice ou non réductrice sur un gel 12% acrylamide (**Figure 33**).



**Figure 33 : Contrôle de pureté du Flt3-L par SDS-PAGE**

On retrouve une protéine de poids moléculaire de l'ordre de 60 kDa, correspondant à un trimère de Flt3-L et 2 bandes de poids moléculaire compris entre 20 et 25 kDa, correspondant à 2 formes de monomère de Flt3-L avec des glycosylations différentes. En présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol, on ne note pas d'action sur la bande à 60 kDa, attestant de l'absence de pont disulfure impliqué dans la formation du trimère.

### 3- Production des anticorps déplétants

#### a- Production des anticorps déplétants

Afin de déterminer quelles sont les populations immunitaires responsables de l'augmentation de survie des souris ayant reçu le traitement par le Flt3-L, il est envisagé d'utiliser des anticorps déplétants sélectifs (anti-CD4, anti-CD8 et anti-NK). Les caractéristiques de ces anticorps sont détaillées dans le **tableau XIX** et leurs conditions de culture sont détaillées **tableau XX**. Afin de faciliter leur purification, les hybridomes croissent en milieu sans sérum ou en milieu avec du SVF déplété en Ig de veau. Les différents hybridomes sontensemencés à 50 000

cellules/ml et cultivés jusqu'à la survenue de 90% de mortalité. Le surnageant est ensuite récolté et filtré stérilement (0.45  $\mu$ m) en attente de purification.

**Tableau XIX : Caractéristiques des anticorps déplétants**

Anticorps	Isotype	Cible	Fournisseur
<b>Anti-NK (PK136)</b>	IgG2a de souris	NK1.1 murin	Hybridome ATCC (HB-191)
<b>Anti-CD4 (GK1.5)</b>	IgG2b de rat	L3T4 murin	Hybridome ATCC (TIB-207)
<b>Anti-CD8 (2.43)</b>	IgG2b de rat	Lyt2.2 murin	Hybridome ATCC (TIB-210)

**Tableau XX : Conditions de culture des hybridomes**

Anticorps	Milieu de culture	Conditions de culture
<b>PK136</b>	CD Hybridoma (Life technologies SAS, Saint-Aubin, France), 8 mM glutamine, 100 U/ml pénicilline, 0,1 mg/ml streptomycine	37°C, 5% CO <sub>2</sub> , 100% humidité
<b>GK1.5</b>	IMDM (Lonza, Bâle, Suisse), 10% SVF déplété, 4 mM glutamine, 100 U/ml pénicilline, 0,1 mg/ml streptomycine	37°C, 5% CO <sub>2</sub> , 100% humidité
<b>2.43</b>	DMEM (Gibco), 10% SVF déplété, 2 mM glutamine, 100 U/ml pénicilline, 0,1 mg/ml streptomycine	37°C, 5% CO <sub>2</sub> , 100% humidité

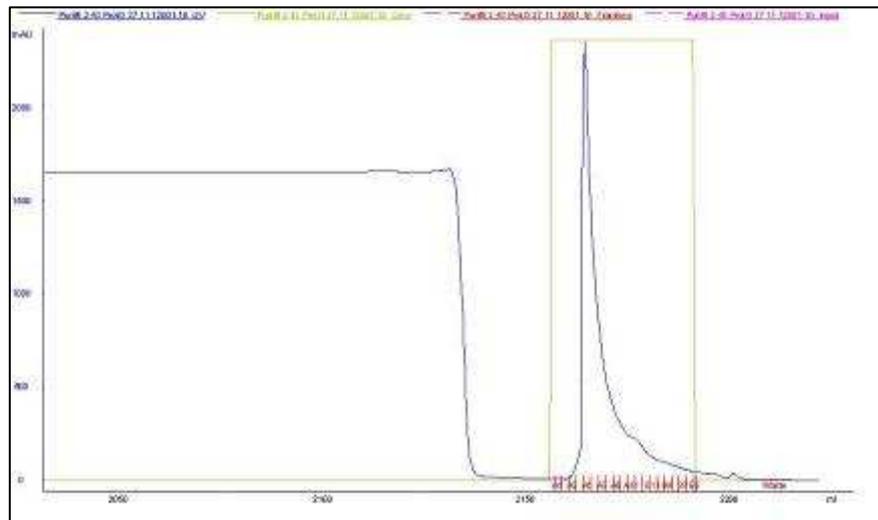
#### b- Purification des anticorps déplétants

La purification des anticorps est réalisée sur colonne de protéine G (GE Healthcare). L'équilibration de la colonne se fait avec 8 volumes (40 ml) de tampon phosphate 20 mM, pH 7 à 3 ml/min. Le passage du surnageant pur sur la colonne s'effectue à 2 ml/min, ce qui permet la fixation des anticorps aux protéines G par leur partie Fc. L'élution se pratique grâce à un tampon glycine 0.1 M, pH 2.9, permettant le décrochage des protéines associées aux protéines G (**Figure 34**). La collection des fractions d'élution se fait dans des tubes contenant un tampon de neutralisation (Tris-HCl 1 M, pH 9) sur la base de la mesure de l'absorbance à 280 nm. Les fractions éluées sont regroupées et subissent une dialyse en PBS 1X sur la nuit. Après dialyse, la solution d'anticorps subit une filtration sur 0.22  $\mu$ m et une élimination des endotoxines par colonne d'affinité dont l'efficacité est attestée par un dosage d'endotoxine.

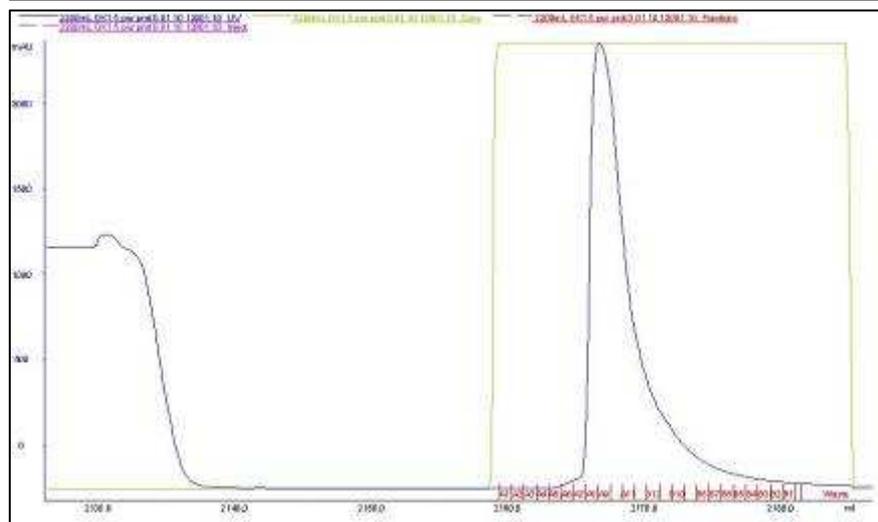
PK136  
(anti-NK)



GK1.5  
(anti-CD4)



2.43  
(anti-CD8)

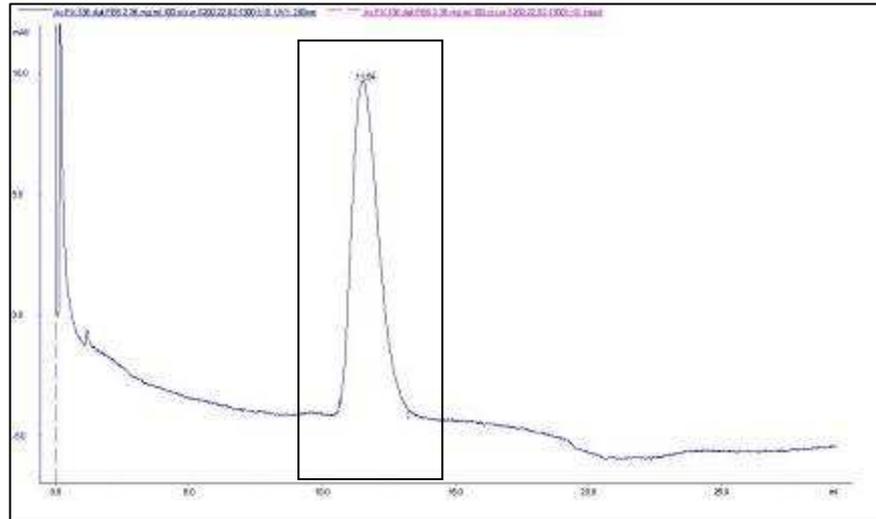


**Figure 34 : Profils d'élution des anticorps déplétants**

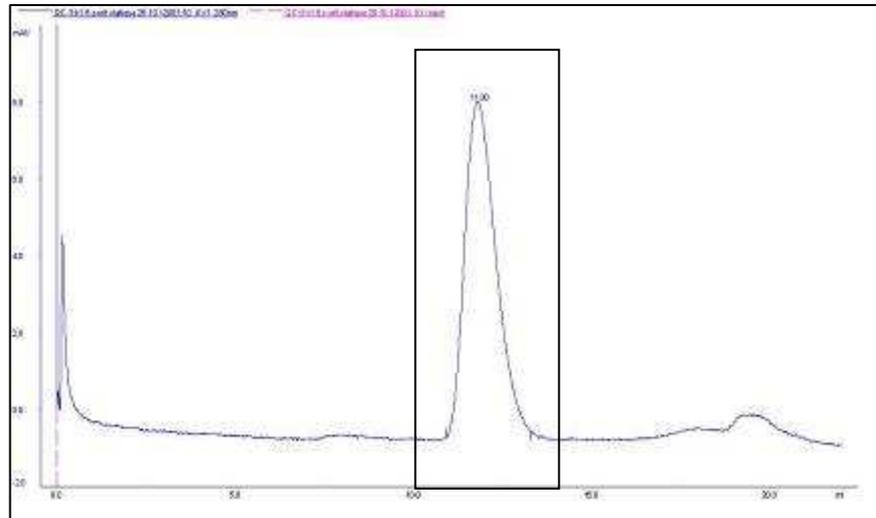
Le pic majoritaire indique les fractions contenant les anticorps, qui seront récoltées

Le contrôle de pureté des anticorps est effectué par passage sur une colonne de gel filtration S200 (**Figure 35**).

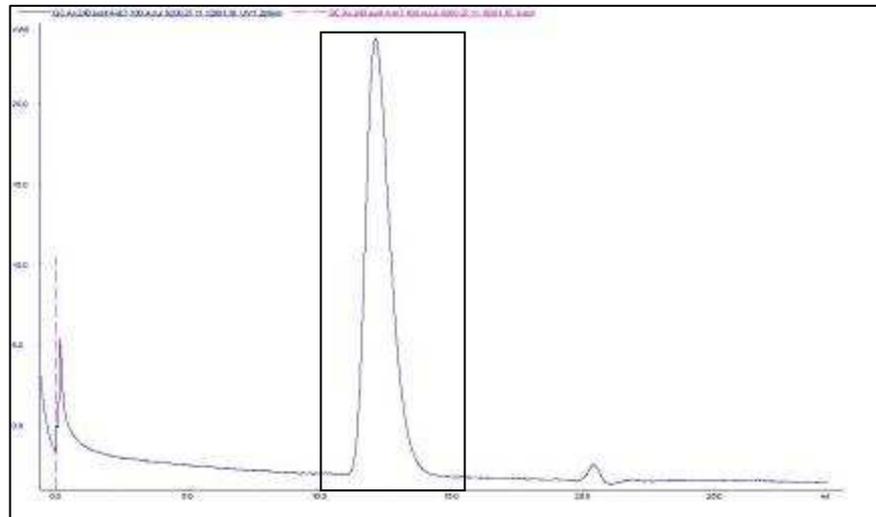
PK136  
(anti-NK)



GK1.5  
(anti-CD4)



2.43  
(anti-CD8)



**Figure 35 : Contrôle de pureté des anticorps déplétants**  
Le pic majoritaire témoigne de la pureté des anticorps obtenus.

## c- Cytométrie sur leucocytes et splénocytes

L'efficacité des déplétions sélectives est évaluée par cytométrie sur les leucocytes du sang et de la rate (n=3 souris pour chaque lot : souris témoins et souris injectées avec chacun des anticorps déplétants). De même, l'effet du Flt3-L sur les différentes populations cellulaires (lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, DC et NK) est documenté par cytométrie sur les leucocytes du sang et de la rate (n=3 souris pour chaque lot : souris témoins non greffées, souris témoins non greffées traitées par le Flt3-L, souris greffées avec des cellules 5T33 et souris greffées avec des cellules 5T33 et traitées par le Flt3-L). Les anticorps utilisés sont détaillés dans le **tableau XXI**.

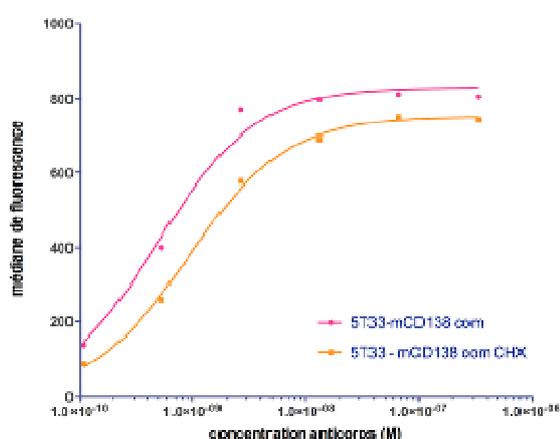
**Tableau XXI : Caractéristiques des anticorps utilisés en cytométrie de flux**

Anticorps	Clone	Fluorochrome	Fournisseur
Anti-CD45 (rat anti-souris)	30-F11	PerCP-Cyanine 5.5	eBioscience, Paris
Anti-CD3 (rat anti-souris)	145-2C11	FITC	eBioscience, Paris
Anti-CD8 (rat anti-souris)	53-67	APC- eFluor® 780	eBioscience, Paris
Anti-CD4 (rat anti-souris)	RM4-5	PE-Cyanine 7	eBioscience, Paris
Anti-CD11c (rat anti-souris)	N418	eFluor® 660	eBioscience, Paris
Anti-NK1.1 (souris anti-souris)		PE	eBioscience, Paris

**4- Préparation de l'anticorps anti-CD138**

Le matériel et méthodes concernant l'obtention du <sup>213</sup>Bi et couplage à l'anticorps a déjà été décrit dans la première partie de ce travail. La fixation d'un agent chélatant sur l'anticorps peut cependant, dans certains cas, modifier son affinité. L'immunoréactivité de l'anticorps anti-CD138 murin couplé au CHX-A''-DTPA est évaluée par cytométrie en flux sur la lignée 5T33 après marquage des cellules par l'anticorps anti-CD138 natif ou couplé et par un anticorps secondaire anti-Ig de rat. La mesure de la médiane de fluorescence en fonction d'une gamme de concentration d'anticorps natif ou couplé est détaillée ci-après (**Figure 36**). La cytométrie en flux ne constitue pas en elle-même une technique de mesure de fixation de l'anticorps, cependant, les résultats peuvent être représentés par un modèle de régression non linéaire de type « one binding site ». Ce type de régression permet d'accéder à une valeur apparente de l'affinité et permet de comparer un même anticorps, sous sa forme native et sous sa forme couplée. Les

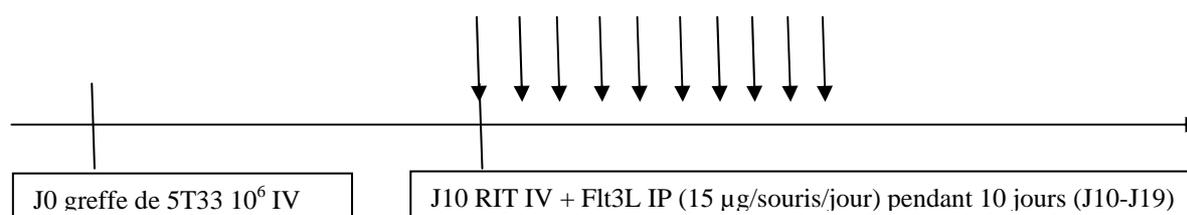
constantes de dissociation (Kd) apparentes sont du même ordre de grandeur pour l'anticorps natif ( $5 \times 10^{10}$ ) et l'anticorps couplé ( $9.2 \times 10^{10}$ ). Ce test simple et rapide permet d'évaluer l'impact global du marquage de l'anticorps sur son immunoréactivité. Bien que les constantes de dissociation apparentes soient du même ordre de grandeur, les niveaux de fixation maximale diffèrent. La modification de l'anticorps suite à la fixation chélate peut avoir entraîné des modifications de certains épitopes reconnus par l'anticorps secondaire couplé à la fluorescéine (FITC), utilisé pour la révélation.



**Figure 36: Estimation de l'immunoréactivité de l'anticorps natif comparé à l'anticorps couplé**  
Étude en cytométrie de flux sur la lignée 5T33 avec des concentrations croissantes en anticorps soit sous forme native (5T33-mCD138 com), soit couplé au CHX-A''-DTPA (5T33-mCD138 com CHX) (détection par un anticorps secondaire anti-rat couplé au FITC)

### 5- Protocole de RIT alpha ( $^{213}\text{Bi-CD138}$ ) associée au traitement par le Flt3-ligand

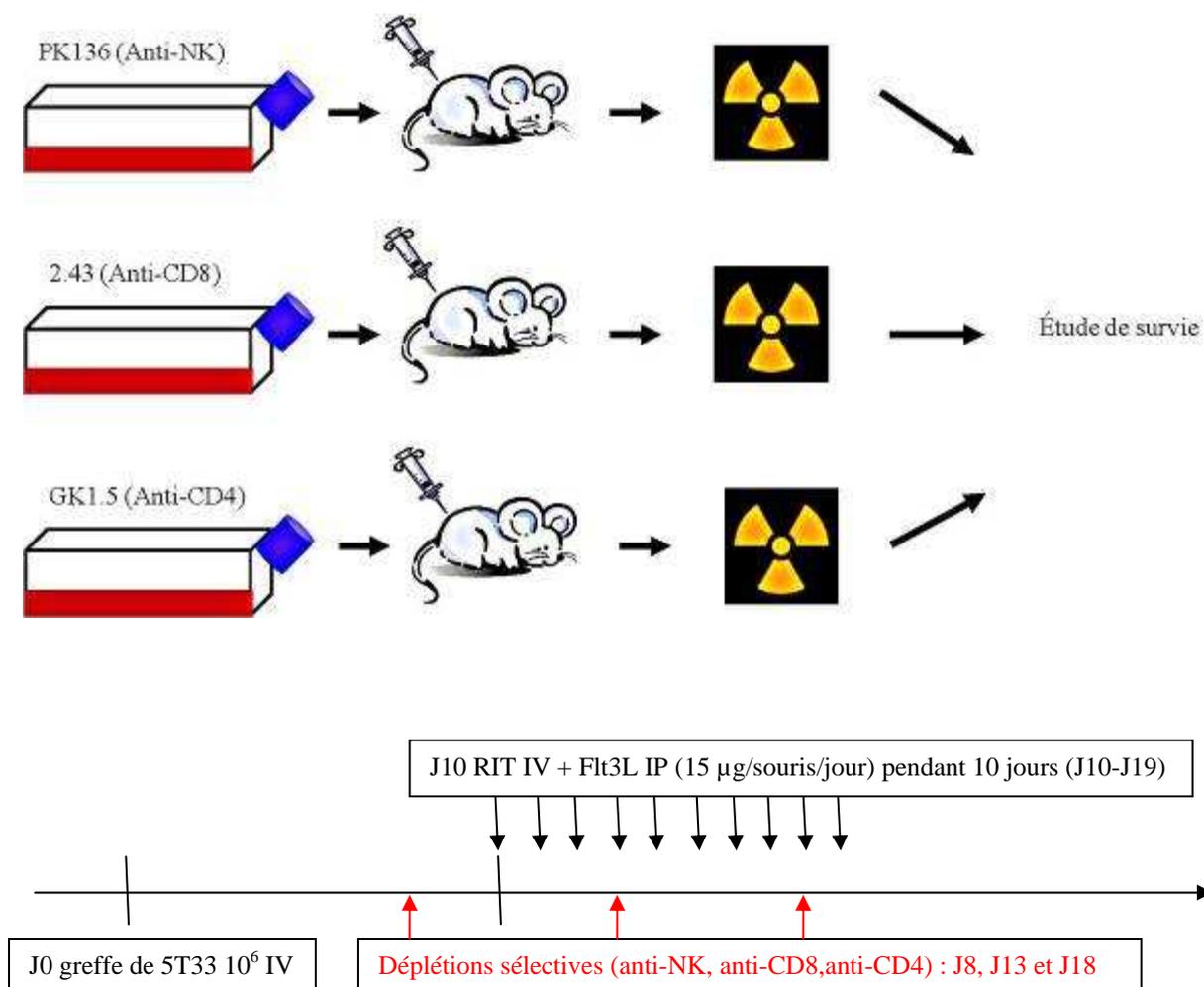
L'effet du Flt3-L lors de la RIT  $\alpha$  avec l'anticorps anti-CD138 murin dans le modèle KaLwRij est déterminé par l'injection IP de 15  $\mu\text{g}$  de Flt3-L par souris et par jour pendant 10 jours, à compter du jour de la RIT. Le protocole de traitement est détaillé **figure 37**.



**Figure 37 : Protocole d'administration du Flt3-L**

## 6- Protocole de RIT alpha ( $^{213}\text{Bi-CD138}$ ) associée au traitement par le Flt3-ligand et à l'administration d'anticorps déplétants

Les anticorps anti-CD8 et anti-CD4 sont administrés tous les 5 jours en IP, à raison de 0.5 mg/souris/injection à J8, J13, J18 (J0 représentant le jour de la greffe). L'anticorps anti-NK est administré également tous les 5 jours en IP, à raison de 0.2 mg/souris/injection aux mêmes temps. Ce protocole a été établi à partir de la littérature faisant état d'une repopulation NK, CD8 et CD4 en 7 jours chez les souris KaLwRiJ après déplétion [4]. Le protocole de RIT est défini comme tel : à J0 les souris sont greffées en intraveineuse avec  $10^6$  cellules 5T33, la RIT est effectuée à J10 et les souris reçoivent, selon les lots, un traitement par le Flt3-L de J10 à J19 et des déplétions sélectives en NK, CD8 ou CD4 à J8, J13 et J18 (**Figure 38**).



**Figure 38 : Protocole de RIT  $^{213}\text{Bi-CD138}$  (activité injectée de 3.7 MBq) couplée aux déplétions sélectives et au Flt3-L**

## 7- Analyses statistiques

Les analyses de survie sont réalisées selon la méthode de Kaplan-Meier et comparées par le test du log-rank. La comparaison des variables quantitatives est effectuée par un test de Student non apparié bilatéral. Les valeurs de  $p < 0.05$  sont considérées comme significatives. Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel Prism (GraphPad Software, San Diego, CA).

## D- Résultats

### 1- Phénotype clinique du modèle murin de greffe de cellules 5T33 dans les souris KaLwRij

#### a- Localisation des cellules tumorales

Dans ce modèle, les cellules tumorales myélomateuses 5T33 se localisent préférentiellement dans la moelle osseuse, où elles remplacent les cellules de la moelle osseuse hématopoïétique, dans la rate, le foie et les nœuds lymphatiques. Il est également noté l'absence de lésions osseuses de type ostéolytique (**Figure 39**).



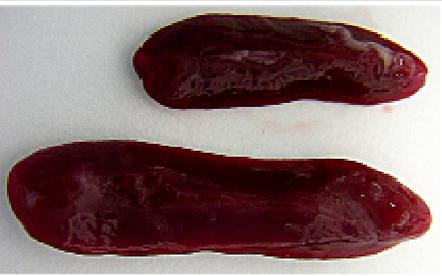
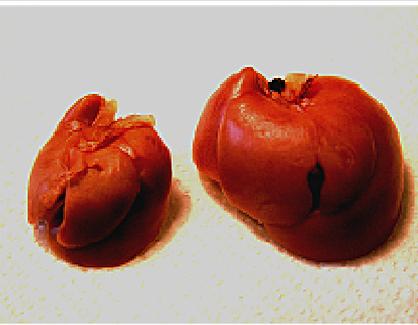
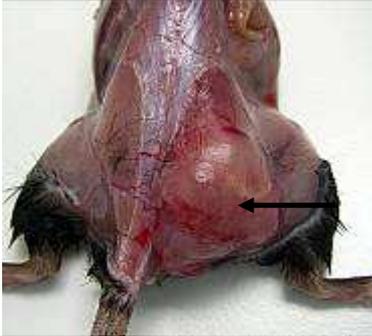
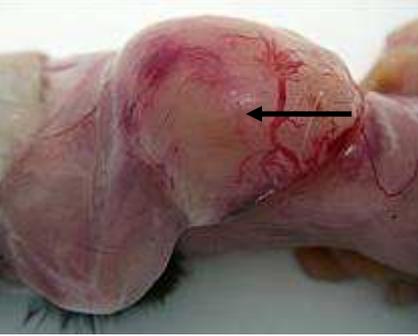
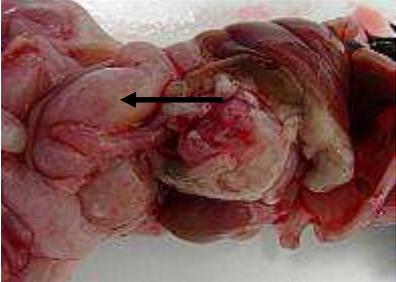
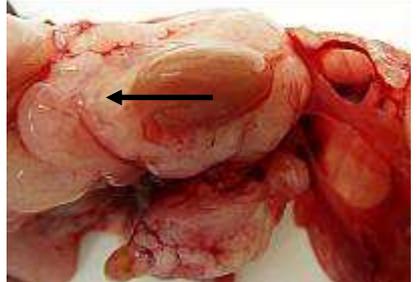
**Figure 39 : Radiographie témoignant de l'absence d'ostéolyse dans le modèle murin 5T33**

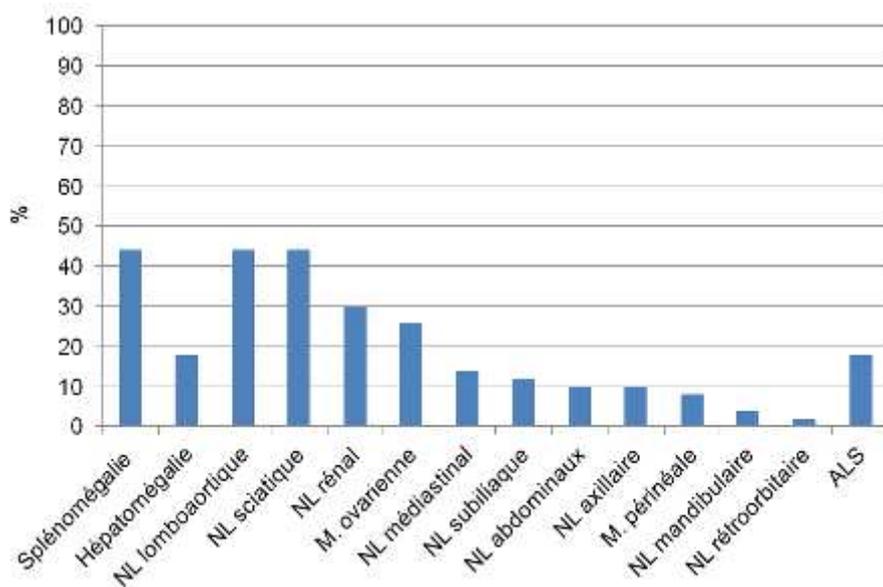
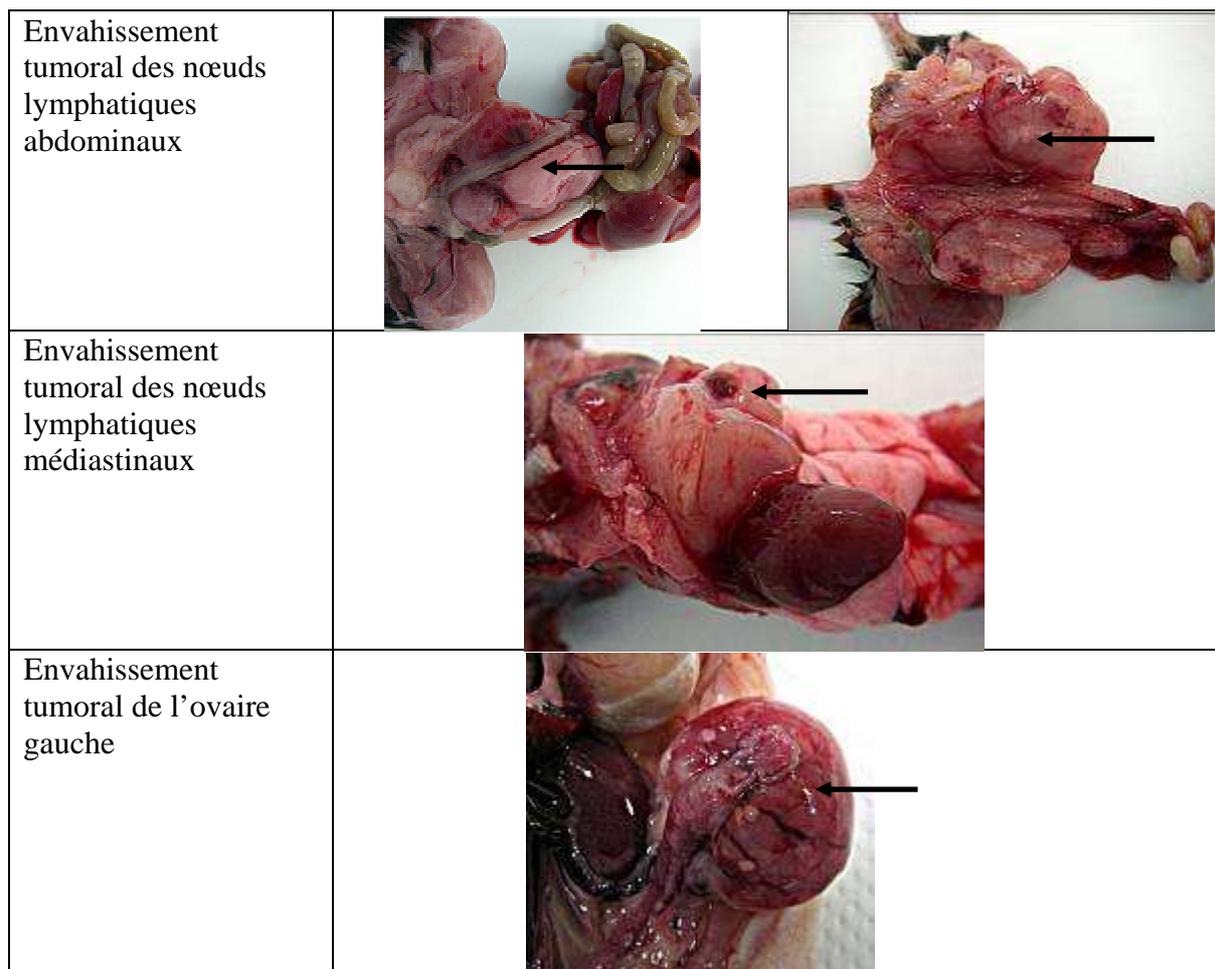
b. Lésions macroscopiques observées

Lors de la survenue de la paralysie postérieure bilatérale, les souris sont sacrifiées pour raison éthique. Elles sont alors systématiquement autopsiées. Les lésions macroscopiques les plus fréquemment rencontrées sont :

- une splénomégalie,
- une hépatomégalie,
- un envahissement tumoral des nœuds lymphatiques sciatiques (droit et/ou gauche),
- un envahissement tumoral des nœuds lymphatiques abdominaux (lombo-aortiques et iliaques),
- un envahissement tumoral des nœuds lymphatiques médiastinaux, rénaux, subiliaques, mandibulaires et axillaires,
- et un envahissement tumoral des ovaires (droit et/ou gauche) (**Tableau XXII**).

**Tableau XXII : Lésions macroscopiques observées**

<p>Splénomégalie (rate témoin en haut)</p> <p>Hépatomégalie (foie témoin à gauche)</p>		
<p>Envahissement tumoral du nœud lymphatique sciatique droit</p>		
<p>Envahissement tumoral des nœuds lymphatiques abdominaux et rénaux</p>		



**Figure 40 : Incidence des lésions macroscopiques observées (n=51 souris)**  
 (ALS : Absence de Lésion Significative)

La **figure 40** détaille l'incidence des lésions observées selon leur localisation, confirmant la localisation préférentielle dans la rate et les nœuds lymphatiques lomboaortiques et sciatiques.

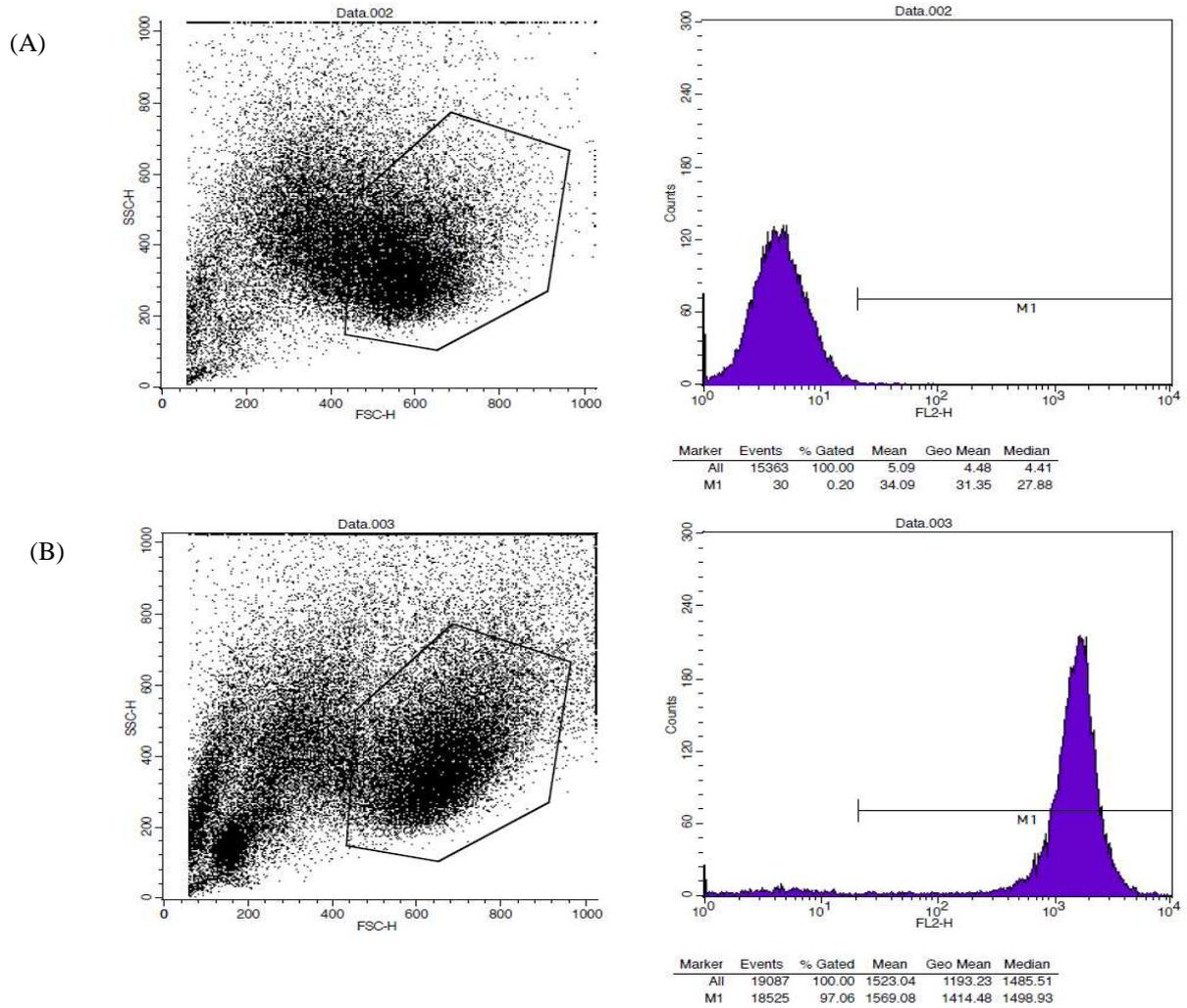
#### c- Lésions histologiques observées

Les lésions histologiques observées consistent en une infiltration diffuse de la pulpe rouge de la rate par les 5T33, à l'origine d'une splénomégalie et une infiltration majoritairement périvasculaire du foie, à l'origine d'une hépatomégalie. La présence de 5T33 dans la rate, contrairement à l'absence de cellules myélomateuses dans la rate humaine lors d'évolution de myélome multiple, peut s'expliquer par le rôle hématopoïétique secondaire de la rate des rongeurs. Nous avons observé également une infiltration par les 5T33 des nœuds lymphatiques, de la médullaire osseuse des fémurs et des ischions, du canal médullaire nerveux, du muscle (notamment des fessiers), de l'ovaire, du pancréas et des méninges. Les racines nerveuses (notamment du nerf sciatique) apparaissent comprimées par les cellules tumorales.

Afin de mieux visualiser les cellules tumorales, une immunohistochimie (IHC) avec un anticorps anti-CD138 murin a été réalisée (**Tableau XXIII**).

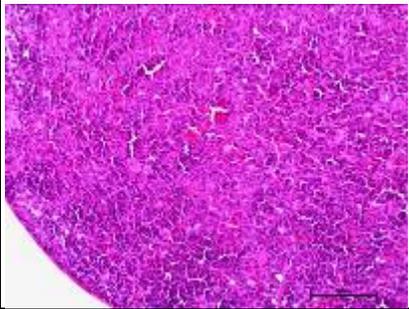
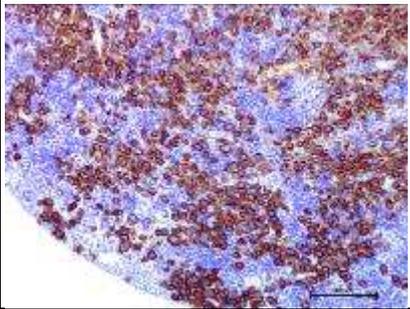
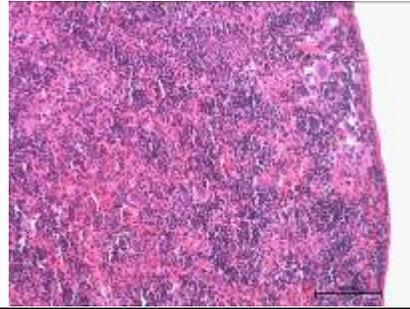
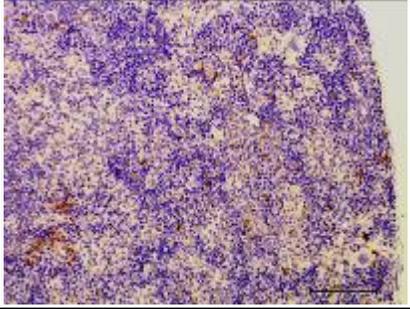
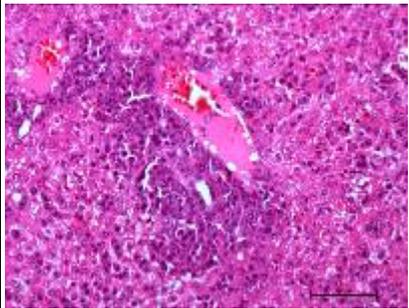
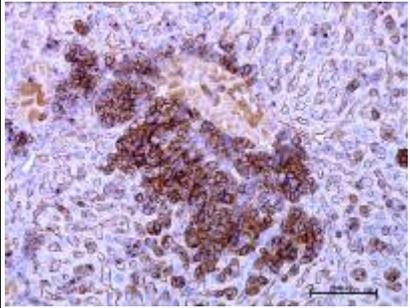
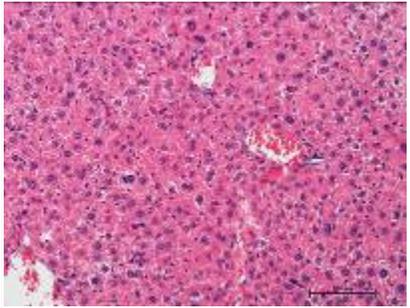
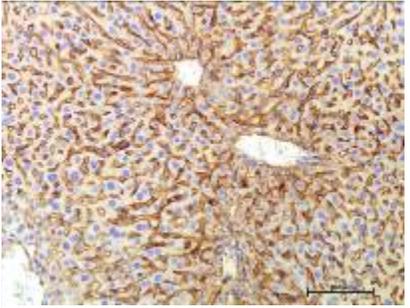
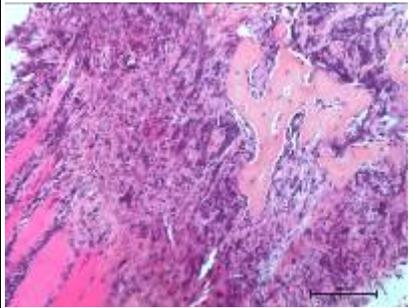
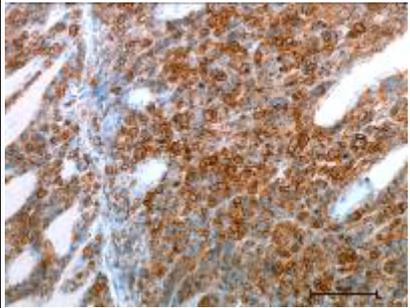
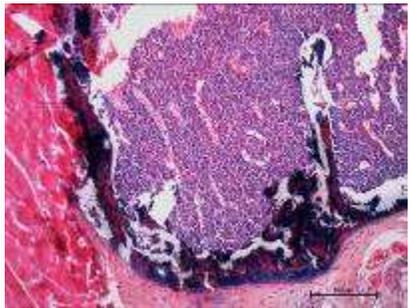
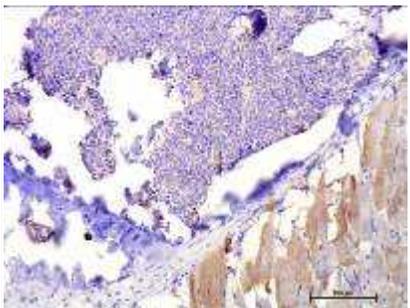
Avant injection aux souris par intraveineuse, nous avons vérifié que les cellules 5T33 exprimaient fortement le CD138 (**Figure 41**) (anticorps anti-CD138 murin, BD biosciences, France).

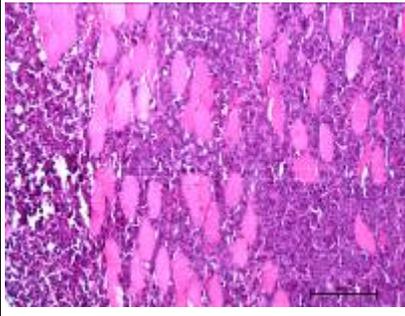
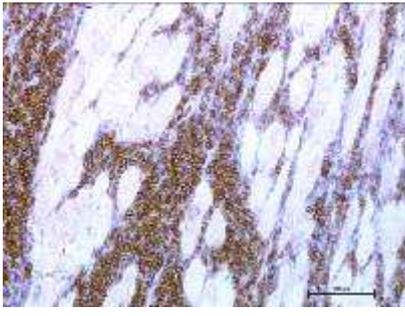
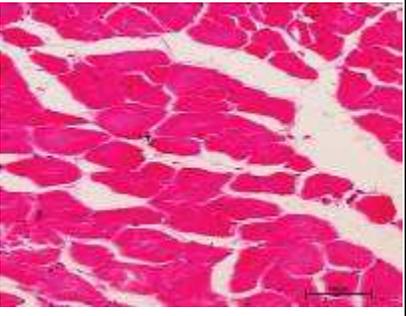
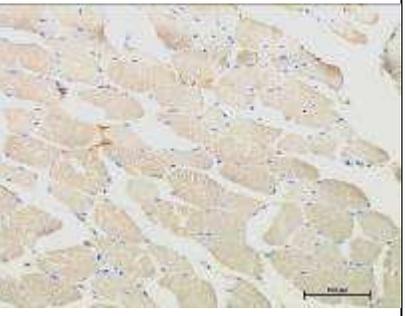
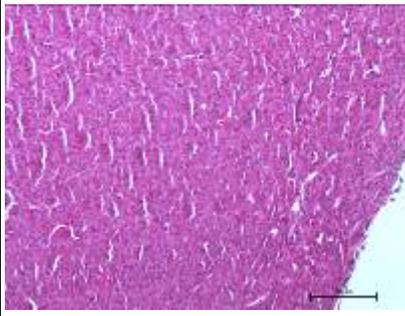
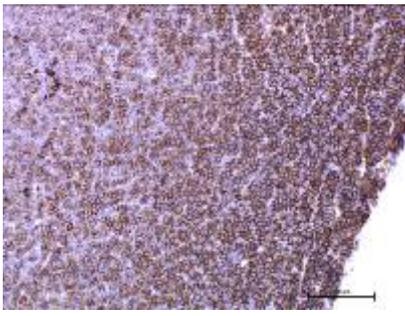
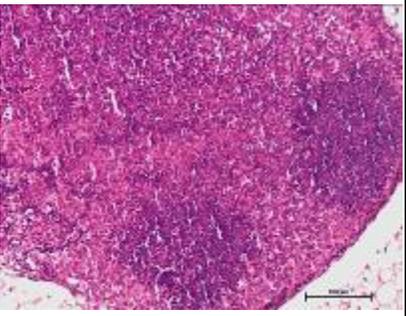
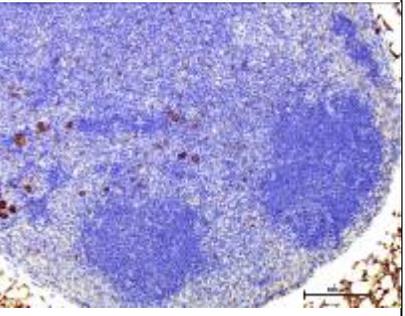
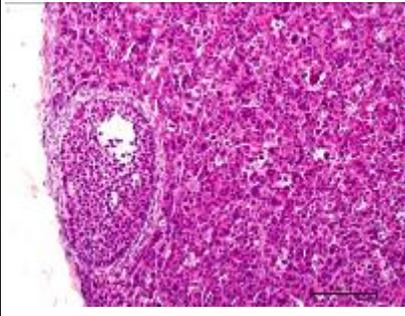
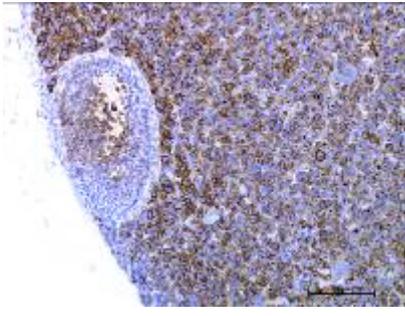
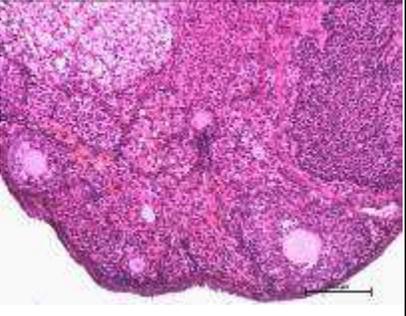
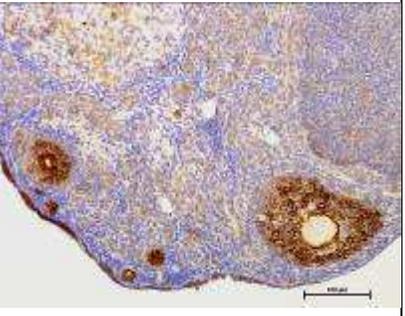
Les cellules tumorales infiltrant la rate, le foie, l'espace médullaire osseux, le canal rachidien, les nœuds lymphatiques, l'ovaire, le pancréas et les méninges sont positives à l'immunohistochimie anti-CD138. Le marquage positif sur les hépatocytes est attribuable à l'expression du CD138 au niveau des microvillosités de la membrane basale des hépatocytes, faisant face à l'espace de Disse [199].

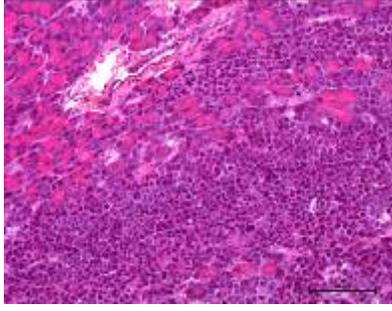
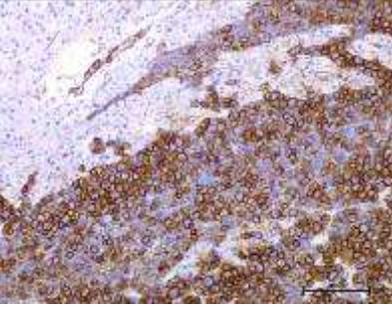
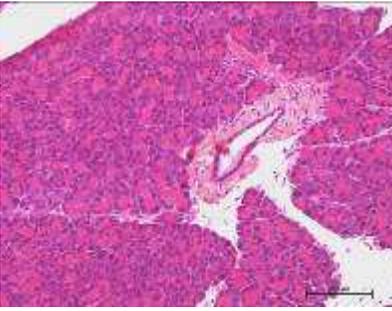
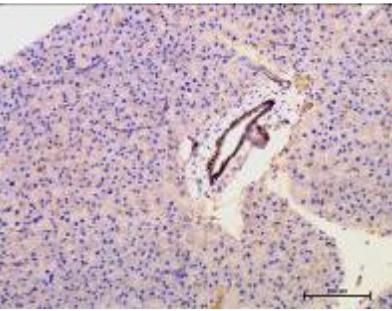
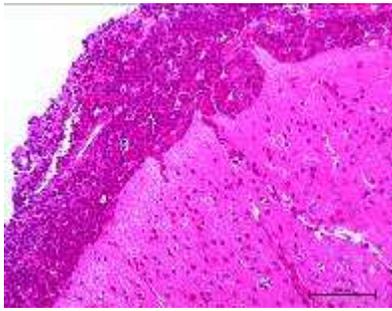
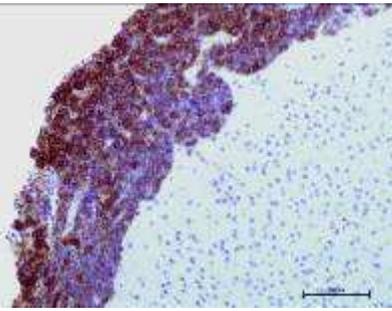
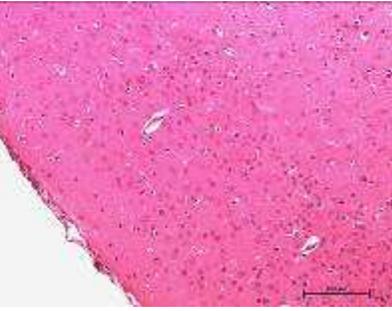
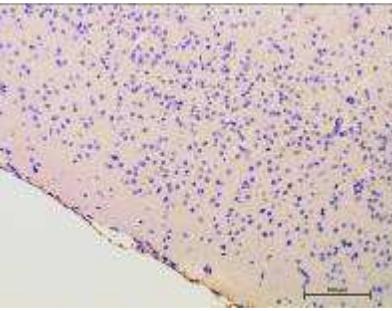


**Figure 41 : Vérification de l'expression du CD138 murin sur les cellules 5T33 avant injection aux souris**  
 (A) 5T33 incubées avec l'anticorps secondaire seul, (B) 5T33 incubées avec le CD138 murin et l'anticorps secondaire.

**Tableau XXIII : Caractérisation histopathologique et immunohistochimique du modèle 5T33**  
(x200, barre = 100  $\mu$ m)

Organe	HES	IHC anti CD138	HES (tissu sain)	IHC anti CD138 (tissu sain)
<b>Rate</b>				
<b>Foie</b>				
<b>Infiltration médullaire fémorale</b>				

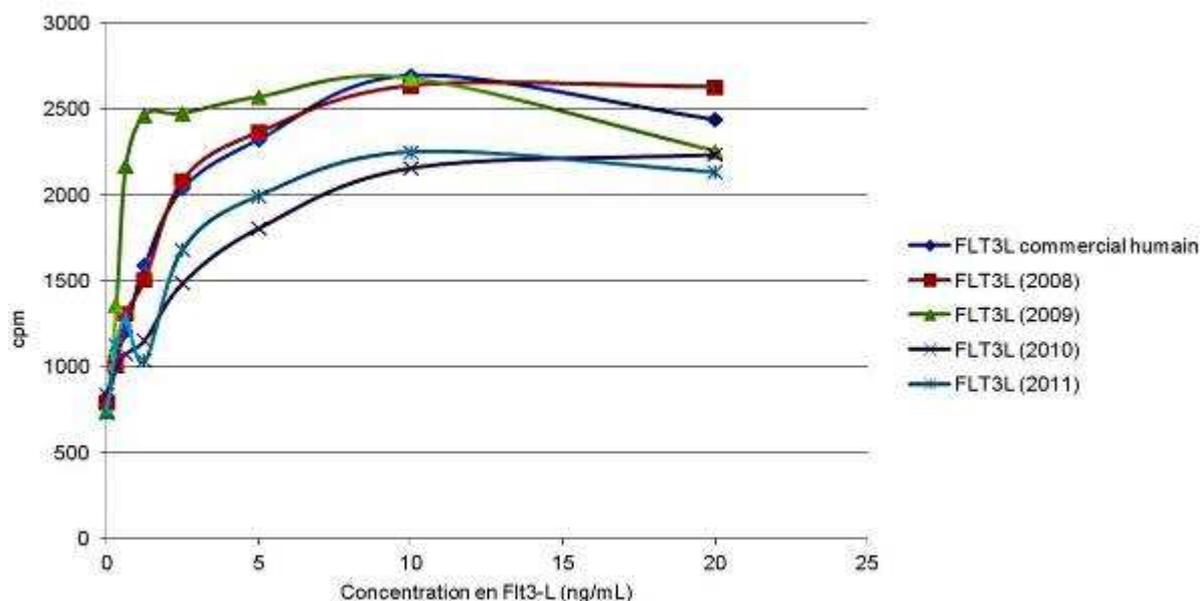
Organe	HES	IHC anti CD138	HES (tissu sain)	IHC anti CD138 (tissu sain)
<b>Infiltration intramusculaire</b>				
<b>NL sciatique</b>				
<b>Ovaire</b>				

Organe	HES	IHC anti CD138	HES (tissu sain)	IHC anti CD138 (tissu sain)
<b>Pancréas</b>				
<b>Méninges</b>				
<b>Envahissement du canal rachidien d'une vertèbre lombaire</b>				

## 2- Contrôle des propriétés fonctionnelles du Flt3 ligand

### a- Contrôle de l'efficacité *in vitro* du Flt3-L

Les cellules Oci-AML5 (DSMZ-ACC 247, Leibniz Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) sont une lignée de cellules humaines de leucémie myéloïde. La croissance de ces dernières est dépendante de la présence de Flt3-L dans le milieu de culture. Ce phénomène va donc être exploité afin de tester la fonctionnalité du Flt3-L. Le test de fonctionnalité du Flt3-L est effectué par un test de prolifération de la lignée Oci-AML5 après sevrage par incorporation de thymidine tritiée après 66h d'incubation à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Des gammes de Flt3-L murin purifié (obtenu suite à différents cycles de production) et de Flt3-L humain commercial (témoin positif) sont réalisées (**Figure 42**). Ce test montre que le Flt3-ligand produit est comparable au Flt3-L commercial et peut donc être utilisé dans nos expériences.

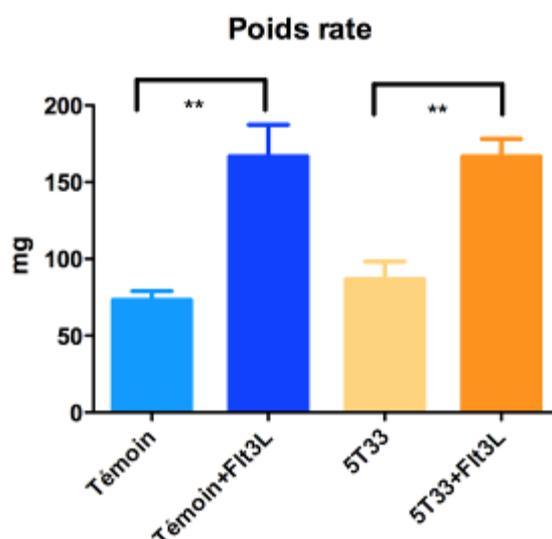


**Figure 42 : Résultat du test d'efficacité du Flt3-L *in vitro* : test de prolifération cellulaire en thymidine tritiée**

Plusieurs lots de Flt3-L ont été testés (2008, 2009, 2010 et 2011)

b- Contrôle de l'efficacité *in vivo* du Flt3-L*Effet du Flt3-L sur le poids de la rate*

L'administration de Flt3-L est à l'origine d'une augmentation statistiquement significative du poids de la rate ( $166.67 \pm 20.82$  mg pour les souris témoins+Flt3L contre  $73.3 \pm 5.8$  mg pour les souris témoins (soit une augmentation de 127%,  $p=0.0017$ ) et  $166.67 \pm 11.5$  mg chez les souris greffées 5T33+Flt3L contre  $86.67 \pm 11.55$  mg pour les souris greffées 5T33 (soit une augmentation de 90%,  $p=0.0011$ )) (**Figure 43**). Aucune différence n'est notée entre le poids des rates des souris témoins et le poids des rates des souris greffées avec des cellules 5T33.



**Figure 43** : Effet du Flt3-L sur le poids de la rate (en mg selon les conditions)

*Effet du Flt3-ligand sur les lymphocytes sanguins et spléniques*

L'administration de Flt3-L est à l'origine d'une diminution du pourcentage de lymphocytes CD4<sup>+</sup> dans le sang pour les souris témoins+Flt3-L ( $p=0.0007$ ) et pour les souris greffées 5T33+Flt3-L ( $p=0.0008$ ) par rapport aux souris témoins non greffées avec les 5T33 et non traitées avec le Flt3-L. Cependant aucune différence n'est notée entre les souris témoins et les souris greffées 5T33 non traitées par le Flt3-L. Le Flt3-L concourrait donc à la diminution du pourcentage de lymphocytes CD4<sup>+</sup> dans le sang. L'administration de Flt3-L ne modifie

aucunement le pourcentage de lymphocytes CD8<sup>+</sup> dans le sang, quelles que soient les conditions (souris témoins ou greffées) (**Figures 44 et 45**).

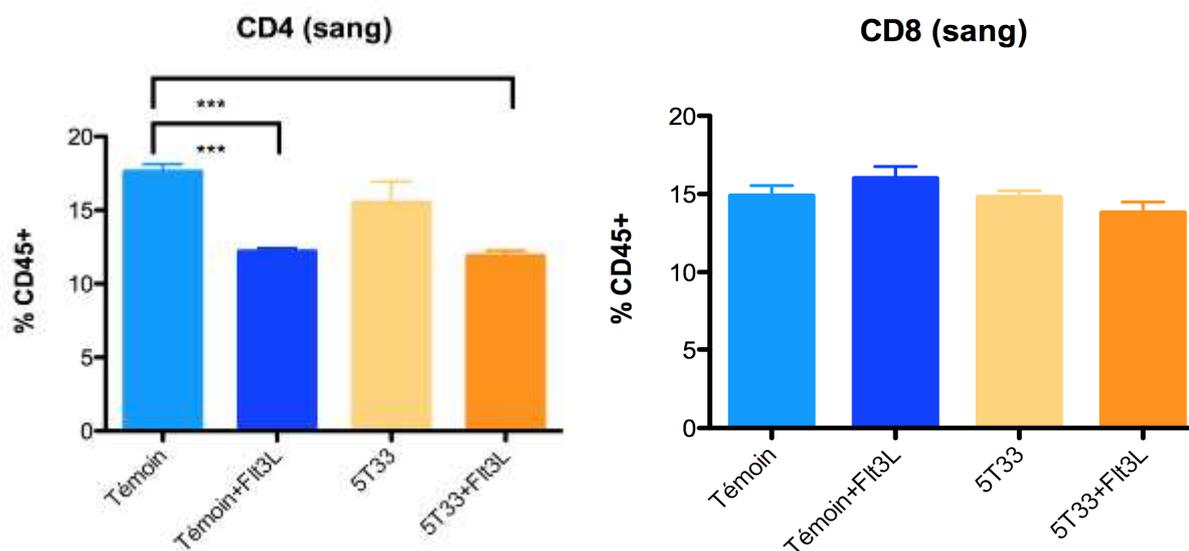


Figure 44 : Effet du Flt3-L sur les lymphocytes sanguins

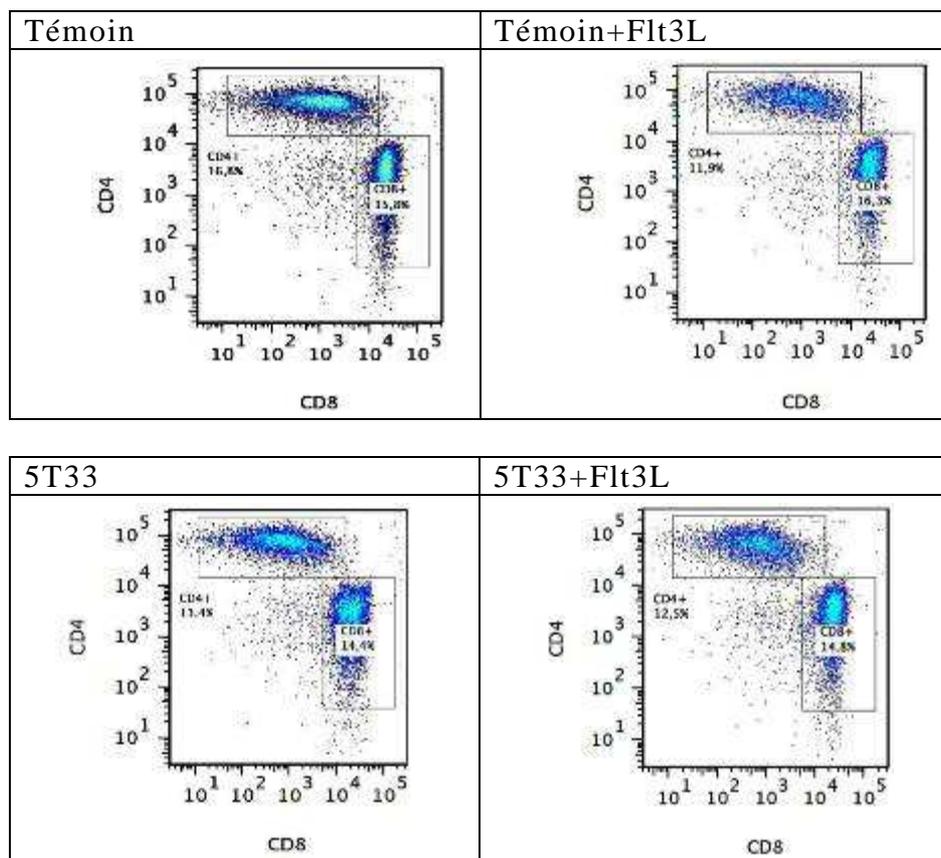
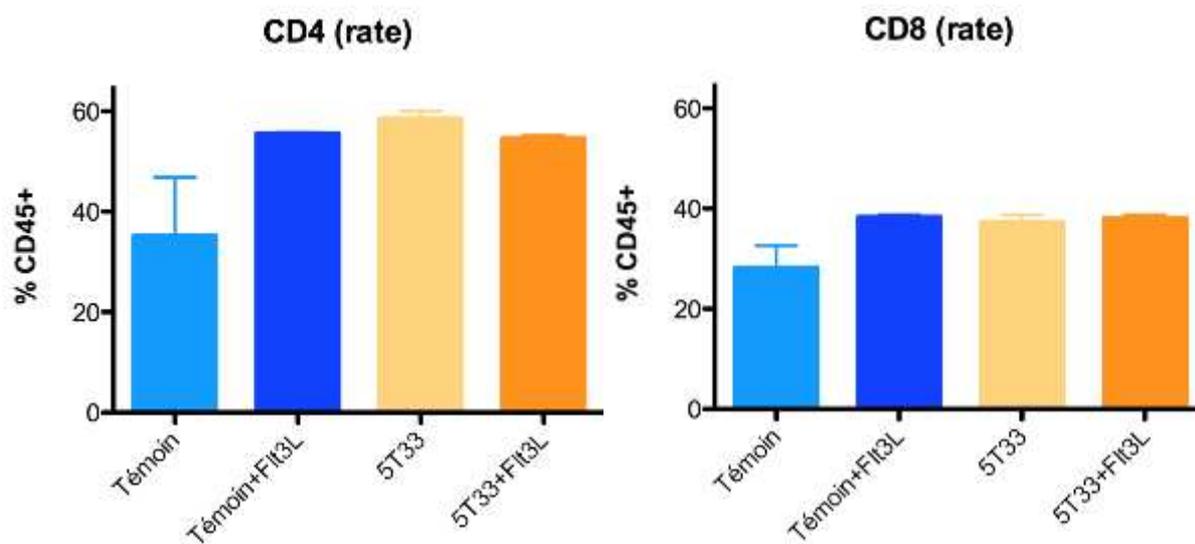


Figure 45 : Influence du Flt3-L sur les lymphocytes T du sang (en pourcentage des cellules CD3<sup>+</sup>)  
L'administration de Flt3-L semble diminuer le pourcentage de lymphocytes CD4<sup>+</sup> mais n'a aucun effet sur le pourcentage des lymphocytes CD8<sup>+</sup> dans le sang

L'administration de Flt3-L n'influence pas le pourcentage de lymphocytes CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> dans la rate, quelles que soient les conditions (souris témoins ou greffées, avec ou sans traitement par le Flt3-L) (**Figure 46**). Nous ne retrouvons pas l'effet de la diminution du pourcentage des lymphocytes CD4<sup>+</sup> observé dans le sang suite à l'administration de Flt3-L. Cependant, nous confirmons l'absence d'effet du Flt3-L sur les lymphocytes CD8<sup>+</sup> de la rate.



**Figure 46** : Effet du Flt3-L sur les lymphocytes spléniques

#### *Effet du Flt3-ligand sur les DC et NK sanguines et spléniques*

L'administration de Flt3-L est à l'origine d'une augmentation statistiquement significative du pourcentage de DC CD11c<sup>+</sup> dans le sang (x4 pour les souris témoins+Flt3-L par rapport aux souris témoins ( $p=0.0019$ ) et x5 pour les souris greffées 5T33+Flt3-L par rapport aux souris greffées 5T33 ( $p<0.0001$ )). Cependant, aucune différence significative n'est notée entre les témoins et les souris greffées 5T33 non traitées par le Flt3-L.

Une augmentation plus modeste du pourcentage des cellules NK NK1.1<sup>+</sup> est également notée suite au traitement par le Flt3-L (x1.3 pour les souris témoins+Flt3-L par rapport aux souris témoins ( $p=0.0977$ ) et x3 pour et les souris greffées 5T33+Flt3-L par rapport aux souris greffées 5T33 ( $p=0.0010$ )) (**Figure 47 et 48**). De plus il est constaté une augmentation du pourcentage des cellules NK due à la greffe des cellules 5T33 (x1.8 entre les souris témoins+Flt3-L et les souris 5T33+Flt3-L ( $p=0.0059$ )). Cette augmentation n'est pas constatée chez les souris greffées par rapport aux souris témoins. L'augmentation du pourcentage

des cellules NK chez les souris 5T33+Flt3-L résulte donc de la conjonction de deux phénomènes : la greffe des cellules 5T33 et l'administration de Flt3-L.

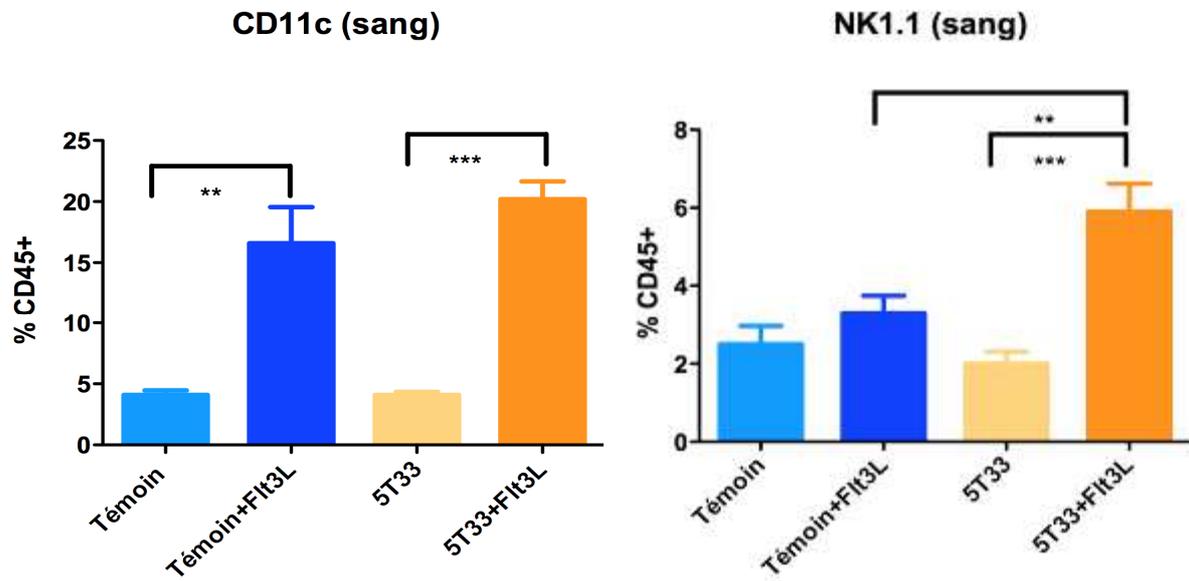
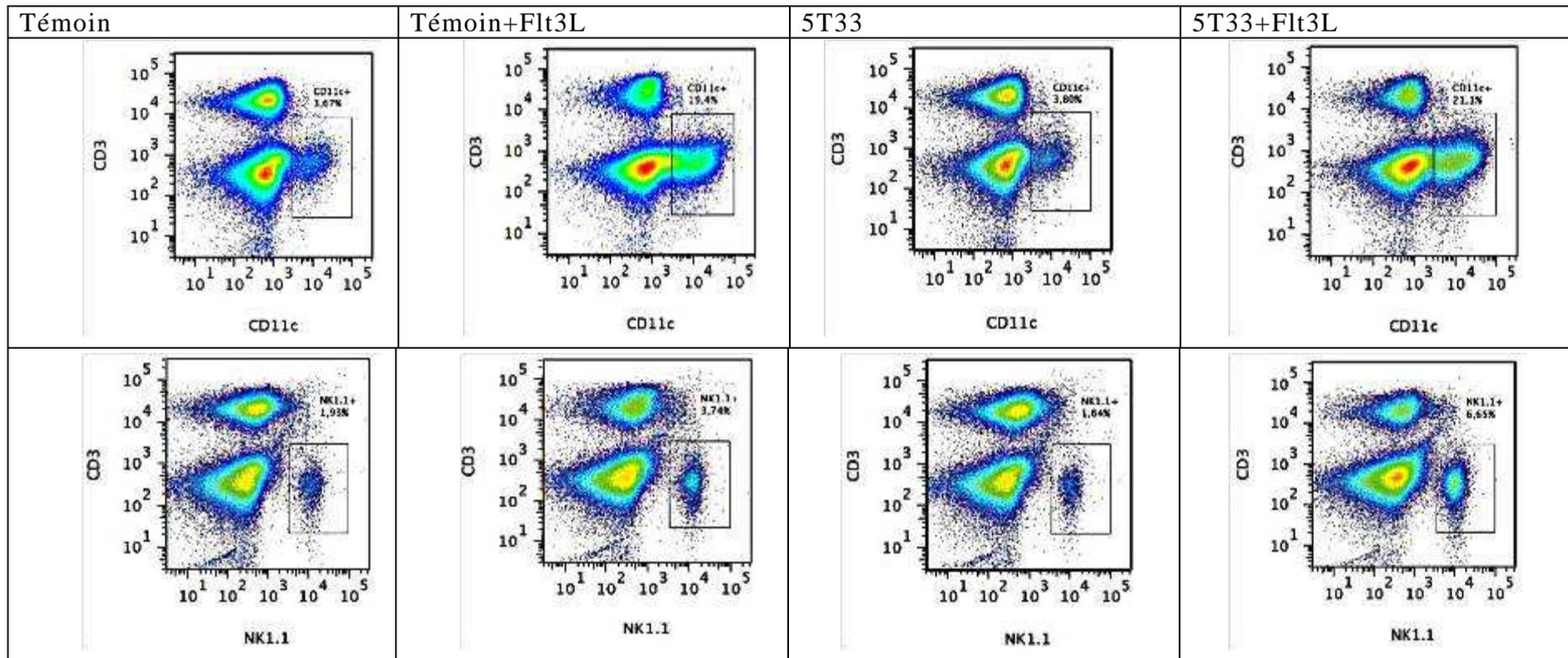


Figure 47 : Influence du traitement au Flt3-L sur les DC et les NK du sang



**Figure 48 : Influence du Flt3-L sur les DC (CD11c<sup>+</sup>) et les cellules NK (NK1.1<sup>+</sup>) du sang (pourcentage des cellules CD45<sup>+</sup>)**

L'administration de Flt3-L est à l'origine d'une augmentation statistiquement significative du pourcentage de DC CD11c<sup>+</sup> dans le sang

L'augmentation marquée du pourcentage des cellules NK chez les souris 5T33+Flt3-L résulte de la conjonction de deux phénomènes : la greffe des cellules 5T33 et l'administration de Flt3-L.

De même, il est noté une augmentation statistiquement significative du pourcentage de DC CD11c<sup>+</sup> dans la rate (x4.8 pour les souris témoins+Flt3-L par rapport aux souris témoins (p=0.0002) et x5.1 pour les souris greffées 5T33+Flt3-L par rapport aux souris greffées 5T33 (p=0.0004)). Cependant, aucune différence significative n'est notée entre les souris témoins et les souris greffées 5T33.

Une augmentation plus modeste du pourcentage des cellules NK NK1.1<sup>+</sup> est également noté (x1.6 pour les souris témoins+Flt3-L par rapport aux souris témoins (p=0.0032) et x2.3 pour les souris greffées 5T33+Flt3-L par rapport aux souris greffées 5T33 (p=0.0027)) (**Figures 49 et 50**). Contrairement aux cellules NK du sang, cette augmentation est également constatée chez les souris greffées par rapport aux souris témoin (p=0.0334). Nous confirmons donc ici, sur les DC et NK de la rate, les résultats obtenus dans pour les DC et NK du sang.

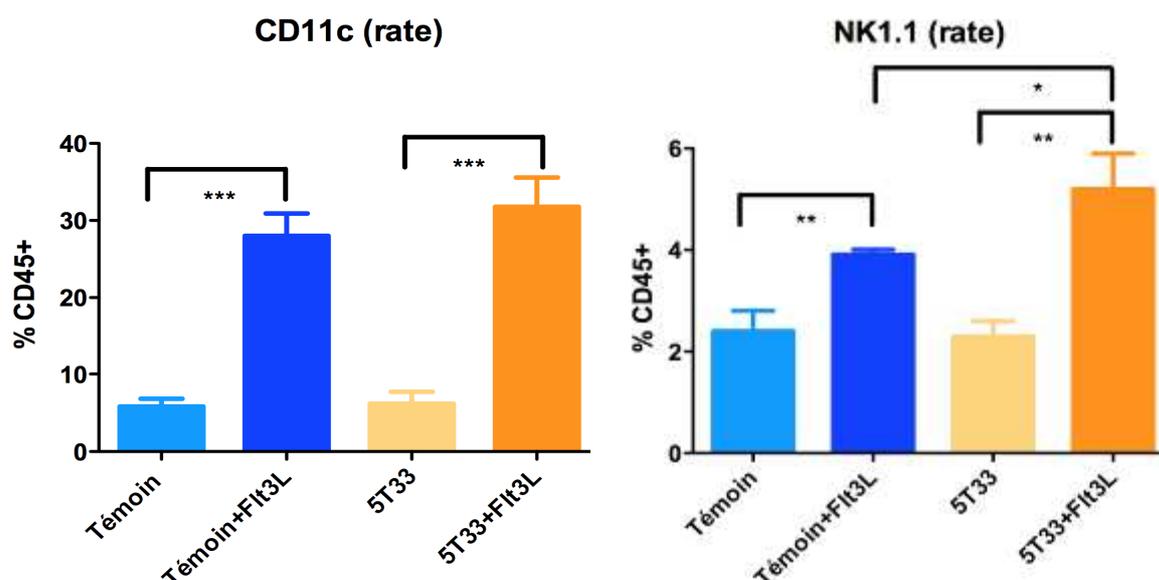
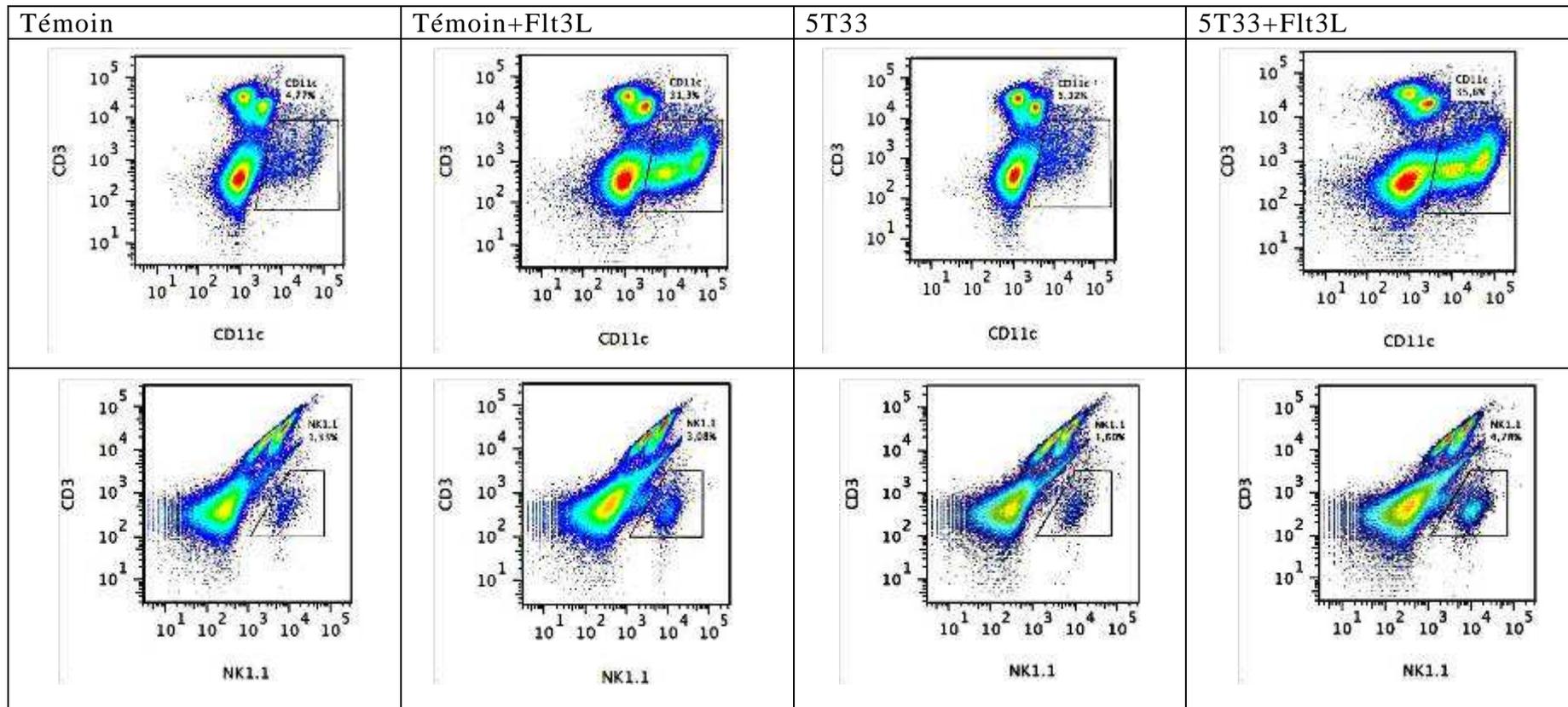


Figure 49 : Influence du traitement au Flt3-L sur les DC et les NK de la rate



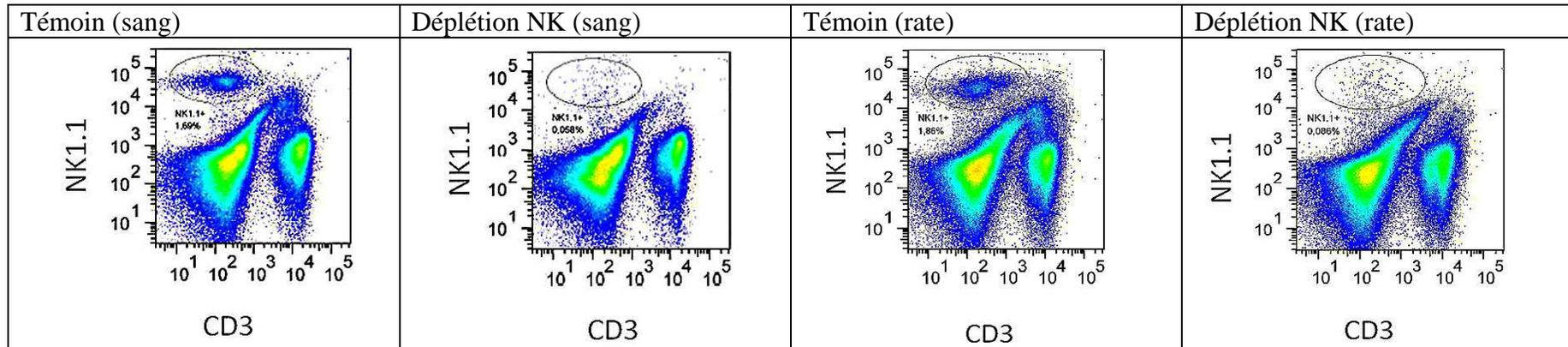
**Figure 50 : Effet du Flt3-L sur les DC (CD11c<sup>+</sup>) et les cellules NK (NK1.1<sup>+</sup>) de la rate (pourcentage des cellules CD45<sup>+</sup>)**

L'administration de Flt3-L est à l'origine d'une augmentation statistiquement significative du pourcentage de DC CD11c<sup>+</sup> et d'une augmentation plus modeste du pourcentage des cellules NK NK1.1<sup>+</sup> dans la rate.

### 3- Vérification des déplétions sélectives

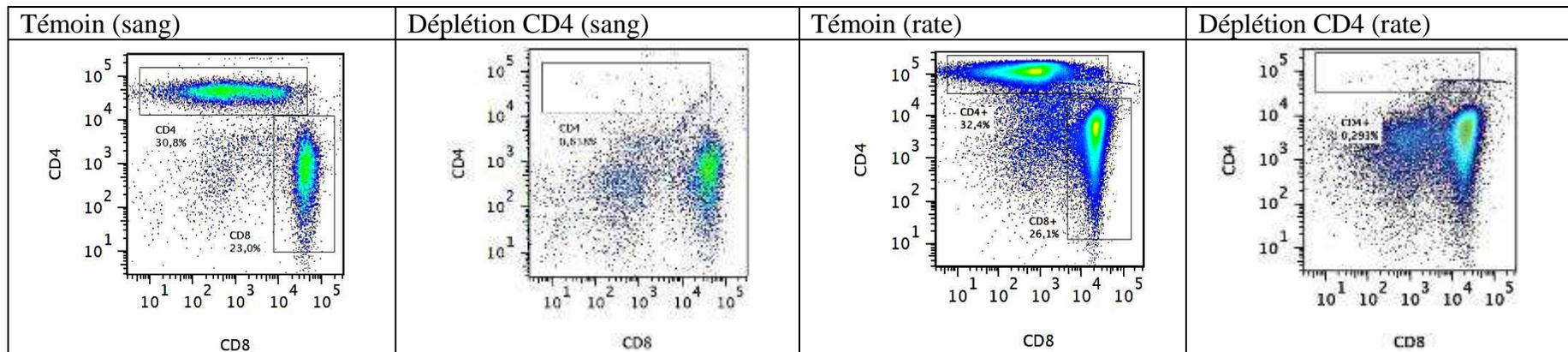
Afin de vérifier que les protocoles de déplétion sont valides, les anticorps déplétants sont injectés conformément au protocole précédemment décrit sur 3 souris KaLwRij/lot (témoin, déplétion NK, déplétion CD4, déplétion CD8). À la fin du protocole, les souris sont sacrifiées et des études de cytométrie de flux sont réalisées sur le sang et la rate. Il apparaît que les protocoles de déplétions sont satisfaisants et sélectifs (**Figures 46, 47 et 48**).

a-Vérification de la déplétion NK



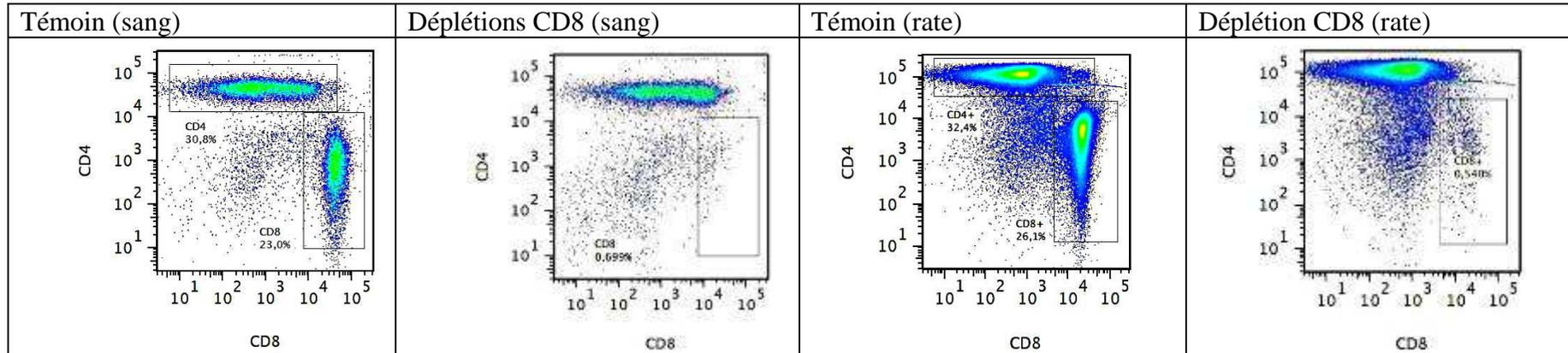
**Figure 51 : Évaluation de l'efficacité de l'anticorps anti-NK sur les cellules NK du sang et de la rate (en pourcentage des cellules CD45<sup>+</sup>)**  
 Suite à l'administration d'anticorps anti-NK, la population NK est diminuée de 96,5% dans le sang et de 95,5% dans la rate

b-Vérification de la déplétion CD4



**Figure 52 : Évaluation de l'efficacité de l'anticorps anti-CD4 sur les lymphocytes du sang et de la rate (en pourcentage des cellules CD3<sup>+</sup>)**  
 Suite à l'administration d'anticorps anti-CD4, la population de lymphocytes CD4<sup>+</sup> est diminuée de 98% dans le sang et de 99% dans la rate

c- Vérification de la déplétion CD8

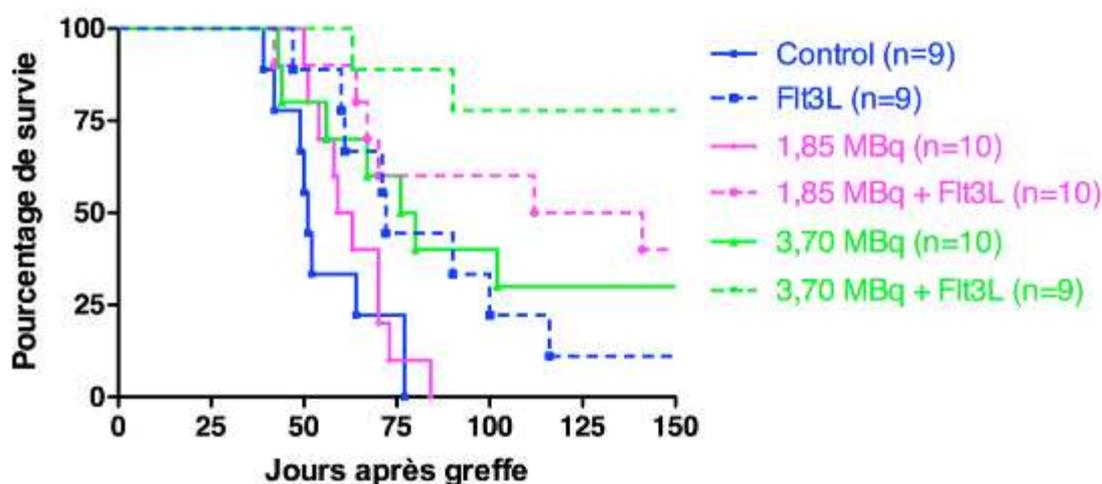


**Figure 53 : Évaluation de l'efficacité de l'anticorps anti-CD8 sur les lymphocytes du sang et de la rate (en pourcentage des cellules CD3<sup>+</sup>)**  
 Suite à l'administration d'anticorps anti-CD8, la population de lymphocytes CD8<sup>+</sup> est diminuée de 97% dans le sang et de 98% dans la rate

#### 4- Association de la RIT alpha ( $^{213}\text{Bi}$ -CD138) et du Flt3-L dans ce modèle

Suite aux travaux *in vitro* de Supiot portant sur l'efficacité de la RIT  $\alpha$  (anti-CD138 humain couplé au  $^{213}\text{Bi}$ ) sur des cellules de myélome humain U266, Chérel *et coll.* ont développé un protocole de RIT du myélome multiple sur le modèle KaLwRij, utilisant l'anticorps anti-CD138 murin couplé au  $^{213}\text{Bi}$  [39, 200]. Dans cette étude, il est noté une augmentation statistiquement significative de la médiane de survie chez les souris traitées avec l'anticorps anti-CD138 couplé au  $^{213}\text{Bi}$  par rapport aux souris témoins ou traitées avec un anticorps non spécifique, couplé au  $^{213}\text{Bi}$  [39].

La preuve de l'efficacité de la RIT alpha sur le modèle de myélome multiple 5T33 à l'aide d'un anti-CD138 murin couplé au  $^{213}\text{Bi}$  ayant été apportée [39], nous nous sommes attachés à évaluer l'efficacité de la RIT en lui adjoignant un traitement par le Flt3-L. L'administration de Flt3-L augmente de façon statistiquement significative la médiane de survie, que ce soit chez les souris témoins ou chez les souris ayant reçu l'anticorps anti-CD138- $^{213}\text{Bi}$  aux activités injectées de 1.85 et 3.7 MBq (**Figure 54**).



	Témoin	Flt3-L	1.85 MBq	1.85 MBq + Flt3-L	3.7 MBq	3.7 MBq + Flt3L
MS (j)	51	72	61	126.5	78	ND

p	Flt3L	1.85 MBq	1.85 MBq + Flt3L	3.7 MBq	3.7 MBq + Flt3L
Témoin	<b>0.0273 (*)</b>	0.394	<b>0.0037 (**)</b>	<b>0.0218 (*)</b>	<b>0.0001 (***)</b>
1.85 MBq			<b>0.0070 (**)</b>	0.0530	
3.7 MBq					<b>0.0364(*)</b>

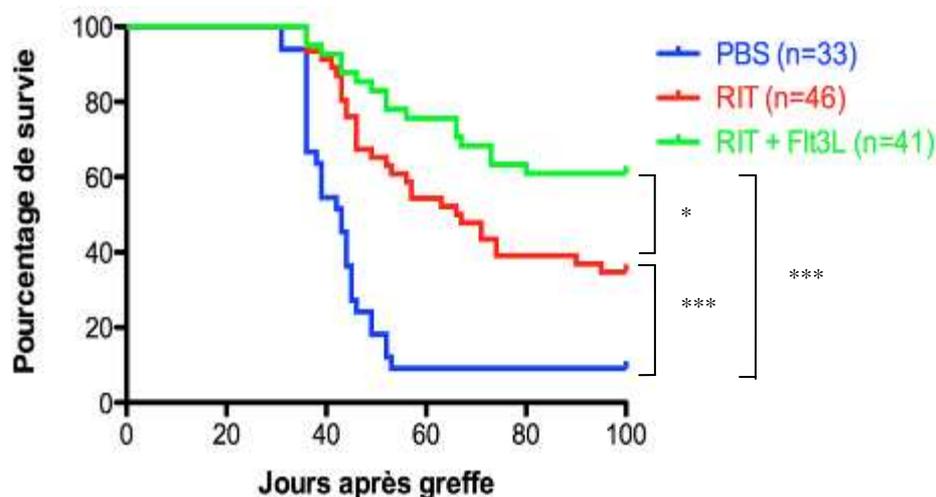
Figure 54 : Étude de l'effet du Flt3-L couplé à la RIT  $\alpha$  anti-CD138- $^{213}\text{Bi}$  sur la survie des souris

Les souris traitées par le Flt3-L seul ont une médiane de survie augmentée de 50% par rapport aux souris témoins. Les souris traitées avec une activité de 1.85 MBq et avec le Flt3-L ont une médiane de survie doublée par rapport aux souris traitées uniquement par RIT à une activité de 1.85 MBq. La médiane de survie n'est pas déterminée pour les souris traitées avec une activité de 3.7 MBq et avec le Flt3-L alors qu'elle est de 78 jours pour les souris traitées avec une activité de 3.7 MBq sans Flt3-L. Pour la suite de cette étude, nous emploierons donc une activité injectée de 3.7 MBq, efficace dans ce modèle 5T33 et non toxique, comme démontré dans la première partie de ce travail.

### 5- Détermination des populations immunitaires impliquées

#### a- Ré-administration

La courbe de survie avant ré-administration montre l'efficacité statistiquement significative de la RIT  $\alpha$  ( $p < 0.0001$ ) et de l'association RIT alpha et le Flt3-L ( $p < 0.0001$ ) sur la médiane de survie des souris (**Figure 55**).



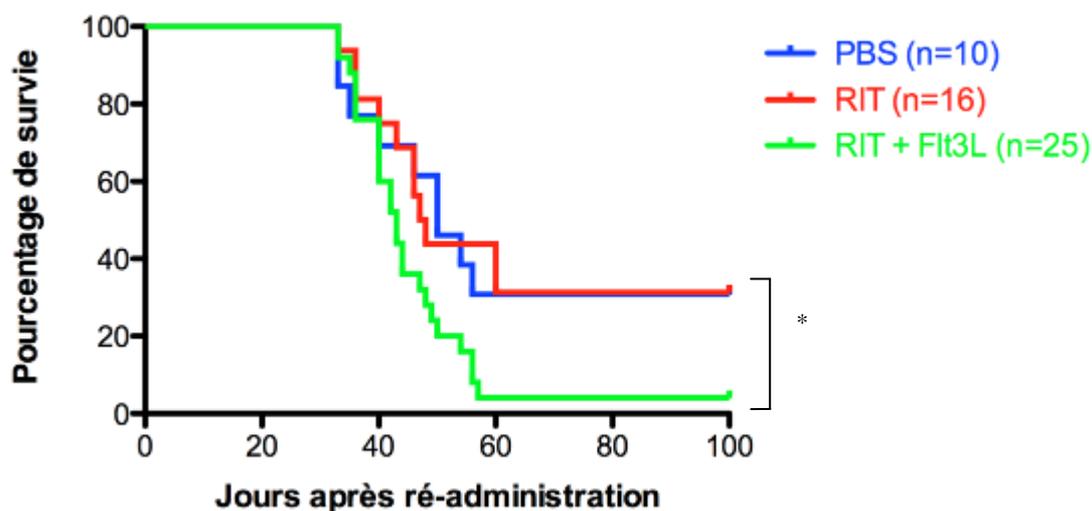
	PBS	RIT	RIT + Flt3L
MS (j)	43	66.5	ND

**Figure 55 : Pourcentage de survie des souris avant ré-administration**

Modèle de myélome multiple sur souris KaLwRij ayant subi une RIT  $\alpha$  anti-CD138- <sup>213</sup>Bi (activité injectée de 3.7 MBq).

Afin de déterminer si les souris ayant survécu à la RIT après greffe de 5T33 ont développé une réponse immunitaire de type mémoire suite au traitement par le Flt3-L, une ré-administration de cellules 5T33 en IV est réitérée, 90 jours après la RIT. Il est à noter que 9% des souris greffées mais non traitées survivent.

Cependant, suite à la réinjection de 5T33 en IV sur les souris ayant survécu aux expériences précédentes, les souris traitées avec l'association RIT  $\alpha$  + Flt3-L ont une médiane de survie inférieure aux souris témoins ( $p=0.0463$ ) et traitées par RIT  $\alpha$  seule ( $p=0.0188$ ) (**Figure 56**).



	PBS	RIT	RIT + Flt3L
MS (j)	50	47.5	43

**Figure 56 : Pourcentage de survie des souris survivantes après ré-administration de 5T33 en IV**

La médiane de survie dans ce groupe est de 43 jours, soit équivalente à la médiane de survie chez les souris témoins lors de la première injection de 5T33. Aucune réponse immunitaire de type mémoire n'a donc pu être mise en évidence. Il apparaît donc que l'augmentation de survie des souris traitées avec la RIT combinée au Flt3-L ne soit pas dépendante d'un mécanisme impliquant les lymphocytes mémoires de type CD8. À noter également que les souris témoins ayant survécu à la première injection de 5T33 résistent également à une deuxième injection de 5T33. Ces souris présentent vraisemblablement une résistance à la greffe des cellules 5T33, dont le support est inconnu.

b- Effet des déplétions sélectives et du Flt3-L sur la progression du myélome multiple

Les déplétions sélectives ne modifient pas la progression du myélome multiple et la survie des souris par rapport aux souris témoins, quelle que soit la population cellulaire déplétée (**Figure 57**).

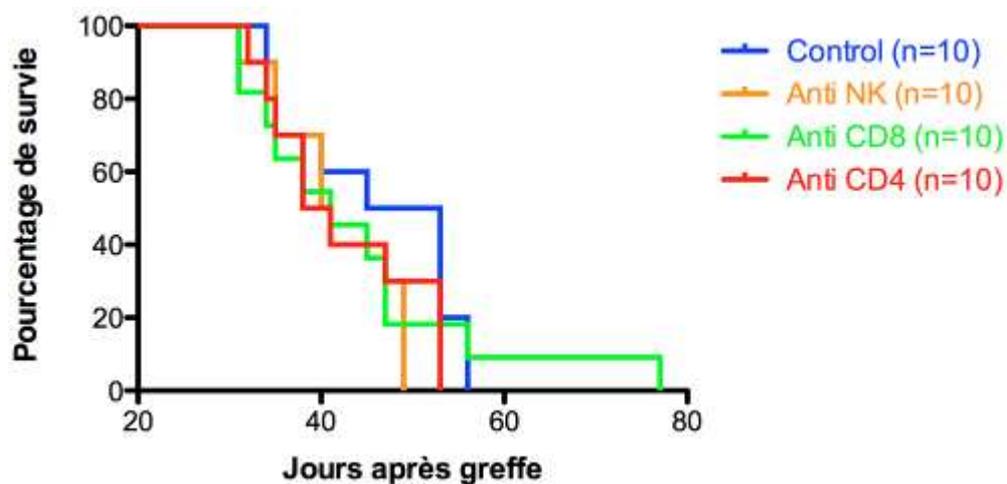


Figure 57 : Pourcentage de survie des souris greffées avec 5T33 et sélectivement déplétées

L'adjonction de Flt3-L aux déplétions sélectives ne modifie pas la progression du myélome multiple et la survie des souris par rapport aux souris témoins non déplétées, quelle que soit la population cellulaire déplétée (**Figure 58**).

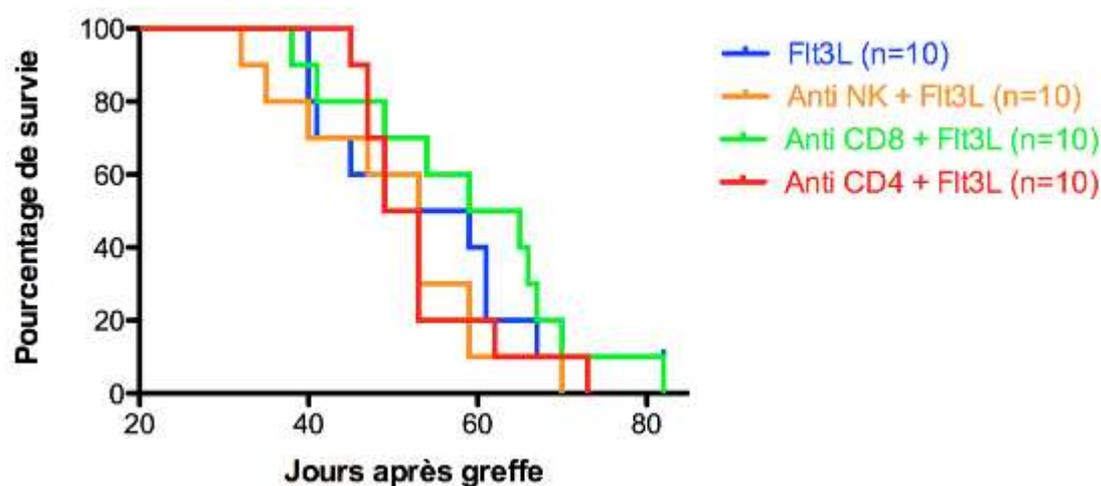
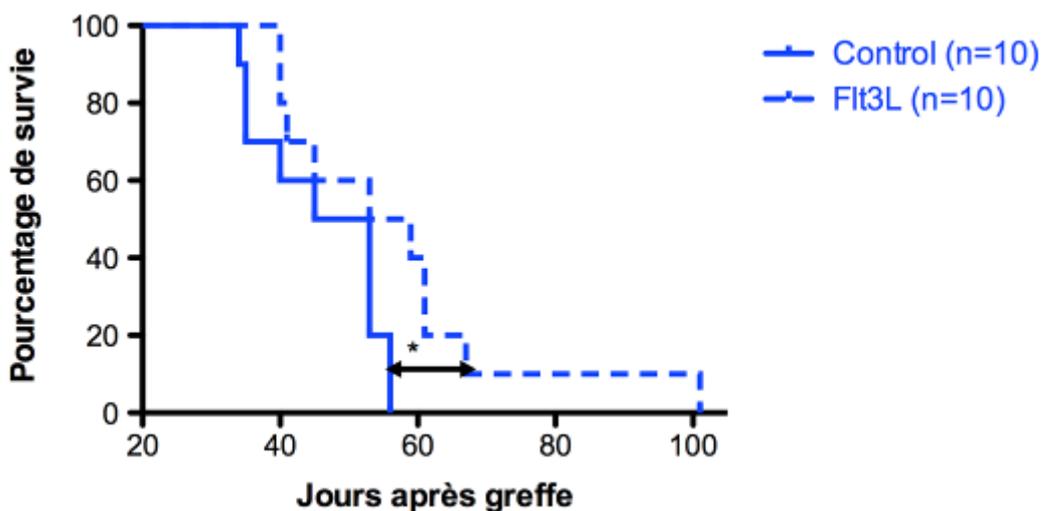


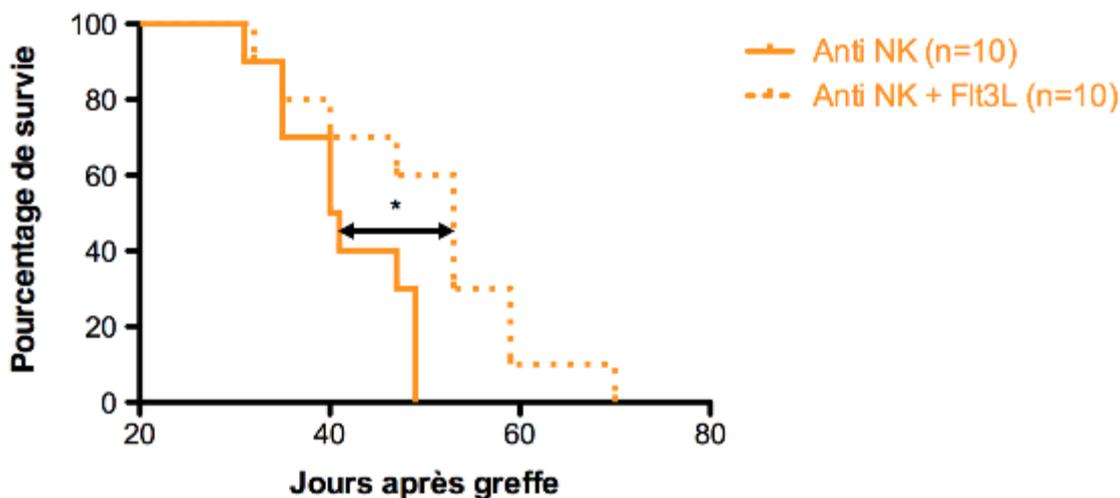
Figure 58 : Pourcentage de survie des souris greffées avec 5T33, traitées au Flt3-L et sélectivement déplétées

Cependant, l'administration de Flt3-L augmente de manière statistiquement significative la survie des souris greffées chez les souris témoins non déplétées ( $p=0.0420$ ), chez les souris déplétées en NK ( $p=0.0206$ ) et en CD4 ( $p=0.0494$ ) mais pas chez les souris déplétées en CD8 (Figures 59, 60, 61 et 62).



	Témoin	Flt3-L
MS (j)	49	56

Figure 59 : Pourcentage de survie des souris greffées avec 5T33, traitées au Flt3-L non déplétées



	Anti-NK	Anti-NK+Flt3-L
MS (j)	40.5	53

Figure 60 : Pourcentage de survie des souris greffées avec 5T33, traitées au Flt3-L et sélectivement déplétées en NK

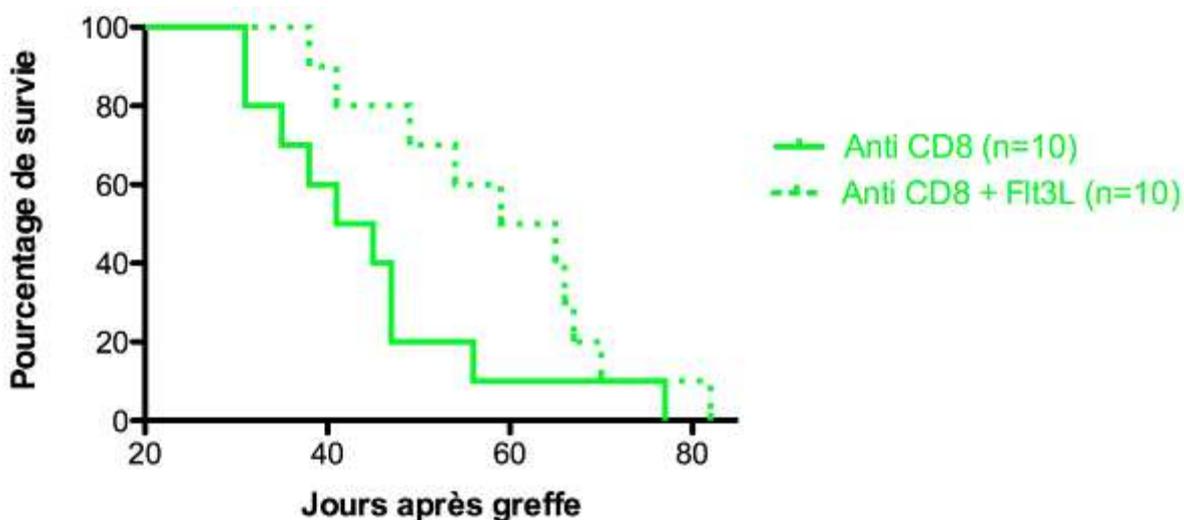


Figure 61 : Pourcentage de survie des souris greffées avec 5T33, traitées au Flt3-L et sélectivement déplétées en CD8

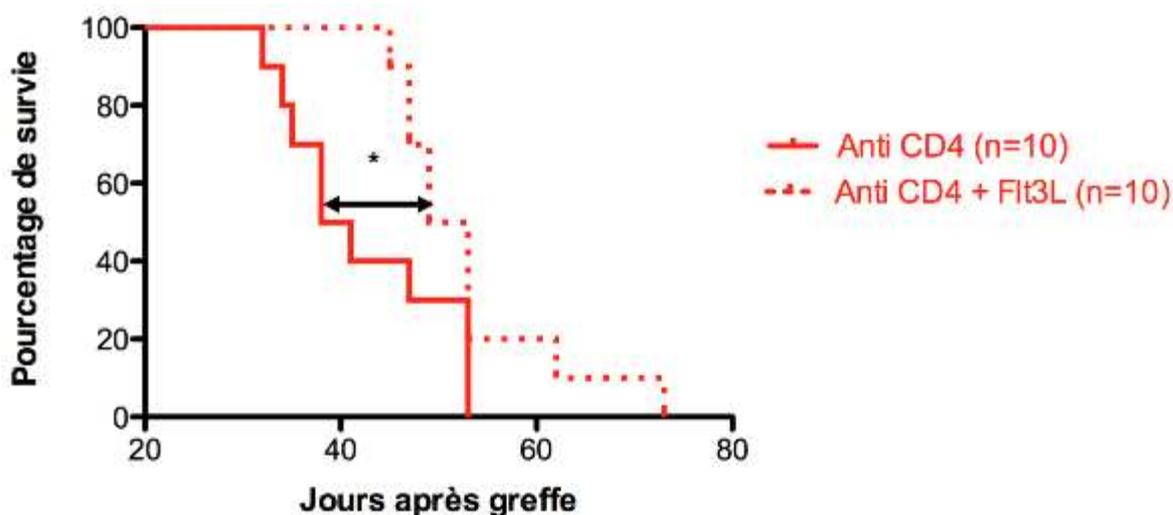


Figure 62 : Pourcentage de survie des souris greffées avec 5T33, traitées au Flt3-L et sélectivement déplétées en CD4

L'expérience consistant à évaluer l'efficacité de la RIT  $\alpha$  anti-CD138-<sup>213</sup>Bi, associée ou non au traitement par le Flt3-L, et ce chez des souris greffées par les cellules 5T33 et sélectivement déplétées en cellules NK ou en lymphocytes CD4 ou CD8 est actuellement en cours. Elle ne figure donc pas dans ce manuscrit, mais les premiers résultats seront communiqués à la soutenance.

## E- Discussion

Dans un premier temps, nous avons réalisé une caractérisation macroscopique, histologique et immunohistochimique du modèle murin syngénique et immunocompétent de myélome multiple, consistant en l'injection de cellules 5T33 en intraveineuse chez des souris KaLwRiJ. Les lésions macroscopiques siègent essentiellement dans la rate, le foie, la moelle osseuse et les nœuds lymphatiques et plus rarement dans les ovaires et le pancréas. Chez l'homme, l'incidence de formes extramédullaires du myélome multiple est de 7 à 18% au diagnostic et atteint 20% au moment d'une récurrence [21]. Cependant, des études rétrospectives portant sur des autopsies de patients atteints de myélome multiple rapportent une incidence de 70% de localisations extramédullaires, principalement au niveau des tissus mous proches des os infiltrés (vertèbres, crâne, côtes, sternum, bassin), de la peau, du foie, de la rate, des nœuds lymphatiques, du système nerveux central et du rein [21, 163]. La localisation ovarienne est rare, quoique reportée dans 4 cas [108, 232]. Plus l'évolution du myélome multiple est longue, plus l'incidence des localisations extramédullaires augmente. Des expériences de bioluminescence, avec des cellules 5T33 exprimant la luciférase, ont permis de montrer une localisation préférentielle des cellules myélomateuses au niveau des os du bassin (à l'origine de la parésie postérieure) et des os du crâne [39].

Pour des raisons économiques, nous avons choisi de produire le Flt3-L. Afin de pouvoir l'utiliser en pleine connaissance dans nos expérimentations, nous avons testé, dans un second temps, ses fonctionnalités *in vitro* et *in vivo*. L'augmentation du poids de la rate suite à l'administration du Flt3-L chez la souris est en accord avec les données de la littérature rapportant une splénomégalie marquée associée à une augmentation marquée de l'hématopoïèse extramédullaire dans la rate de souris suite à l'administration de Flt3-L [192]. De même, une splénomégalie est également associée au traitement par le Flt3-L chez l'homme, objectivée par une augmentation du volume de la rate comprise entre 13 et 84% [133]. L'augmentation observée du pourcentage de DC et de NK dans la rate et le sang est en accord avec les résultats obtenus chez l'homme. En effet, l'équipe de Marroquin reporte une augmentation des DC CD11<sup>+</sup> dans le sang des

patients après injection de Flt3-L (x19 pour un traitement de 25  $\mu$ g/kg pendant 14 jours) [133].

De nombreuses études se sont attachées à démontrer le rôle des cellules immunitaires dans le cadre d'une augmentation de survie suite au traitement avec le Flt3-L. Cependant, il apparaît que les résultats apparaissent contradictoires et dépendent du modèle animal utilisé.

En ce qui concerne l'implication des lymphocytes CD8<sup>+</sup> dans le mécanisme d'action du Flt3-L, une étude de Lynch *et coll.* portant sur des fibrosarcomes induits au méthylchloranthrène, montre que l'effet antitumoral du Flt3-L passe par une réponse T cytotoxique [128]. Merad démontre dans son étude, la résistance des souris survivantes à une ré-administration de cellules tumorales dans un modèle de mélanome murin B16 [143]. Cependant il est fait mention dans cette étude d'une stimulation des souris par des ISS (séquences ADN contenant des îlots CpG capables d'activer les DC en se liant à des TLR spécifiques). L'hypothèse émise par Merad est donc que le Flt3-L stimulerait la prolifération de DC immatures et que les ISS permettraient la maturation de ces DC. Cependant, nous constatons qu'aucune souris ayant survécu à une première RIT alpha (anti-CD138-<sup>213</sup>Bi) ne survit à une deuxième injection intraveineuse de cellules 5T33. Il n'y aurait donc pas d'induction d'effet mémoire lors de la RIT  $\alpha$  anti-CD138-<sup>213</sup>Bi associée au Flt3-L chez les souris greffées par les cellules 5T33. L'augmentation de survie observée lors de l'association RIT+Flt3-L ne serait donc pas liée à l'induction d'une réponse antitumorale de type CD8.

L'étude de Merad démontre que 40% des souris déplétées en CD4<sup>+</sup> succombent à l'invasion tumorale [143]. *A contrario*, nous observons dans notre étude que la déplétion en CD4<sup>+</sup> associée à une RIT et au Flt3L aboutit à une augmentation marquée de la survie des souris (résultats préliminaires à confirmer). Notre hypothèse est que l'effet bénéfique de la déplétion en CD4<sup>+</sup> serait imputable à la déplétion des lymphocytes T régulateurs (Tregs), connus pour contribuer au détournement de la réponse immunitaire locale. Les lymphocytes Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) représentent 5 à 10% des lymphocytes CD4<sup>+</sup> chez les rongeurs. Ils sécrètent du TGF $\beta$  capable d'inhiber directement les fonctions effectrices des cellules NK (sécrétion d'IFN $\gamma$  et cytolyse) et de diminuer l'expression des récepteurs NKG2D (récepteur activateur) à la surface des cellules NK [79]. Des études ont montré que l'utilisation d'anticorps anti-CD25

sur des modèles murins portant des tumeurs augmente l'immunité dépendante des lymphocytes T et la réponse à des thérapies utilisant des DC [161]. Il a de plus été démontré que l'administration d'anticorps anti-CD25 augmente la prolifération et le potentiel cytotoxique des cellules NK [79] et permet la régression tumorale *in vivo* de certains types tumoraux [161]. Cependant, la déplétion utilisant un anticorps anti-CD25 peut également affecter d'autres cellules immunitaires CD25<sup>+</sup> (lymphocytes T, lymphocytes B) ; des études complémentaires sont donc nécessaires pour optimiser son utilisation. De plus, les Tregs semblent contribuer à la dysfonction immunitaire lors du développement du myélome [25]. Cette étude rapporte une surexpression de Foxp3 (x6 par rapport aux témoins) par les cellules médullaires dans 72% des patients à myélome multiple.

Nos hypothèses s'orientent donc vers un rôle des NK dans l'effet du Flt3-L et sont étayées par plusieurs études. Fernandez et Silver décrivent, dans une étude concernant le mésothéliome [68] et le carcinome ovarien humain [193], un effet antitumoral du Flt3-L. Cet effet est abrogé lors du traitement préalable des animaux par des anticorps anti-NK. Ce résultat met en évidence le rôle important des cellules NK dans la médiation de l'effet antitumoral du Flt3-L dans ces modèles. Chen décrit également l'effet antitumoral du Flt3-L chez des souris immunocompétentes greffées avec des cellules de cancer mammaire murin syngénique (C3L5). Cependant, aucune de ces souris ne survit à la réinjection de cellules C3L5, 4 semaines après la première greffe [38]. C'est également ce que nous constatons avec la lignée 5T33. Nous avons constaté précédemment que l'adjonction de Flt3-L chez des souris greffées augmentait le pourcentage de cellules NK dans le sang et la rate. L'hypothèse retenue est donc l'implication de ces cellules NK dans l'augmentation de survie chez les souris traitées avec l'association RIT et Flt3-L.



### **III- Conclusions de la troisième partie**

L'adjonction de Flt3-L à la RIT  $\alpha$  anti-CD138-<sup>213</sup>Bi dans un modèle syngénique immunocompétent de myélome multiple augmente significativement la survie des souris traitées. La question de l'identification de la ou des cellules immunitaires responsables de ce bénéfice thérapeutique se pose. Les expériences de réinjection de cellules 5T33 chez des souris ayant survécu à une première injection suivie d'une RIT  $\alpha$  (associée ou non au Flt3-L), n'ont pas permis de mettre en évidence un effet mémoire. Les déplétions sélectives sur des souris greffées, en l'absence de RIT, n'ont aucun effet sur la progression du myélome. L'adjonction de Flt3-L augmente significativement la survie chez les souris témoins non déplétées et chez les souris déplétées en cellules NK et en lymphocytes CD4<sup>+</sup>.

Les résultats à venir concernant l'évaluation de la RIT associée ou non au Flt3-L sur des souris greffées sélectivement déplétées, permettront de mettre en évidence la ou les populations impliquées dans l'augmentation de survie des souris traitées avec la RIT  $\alpha$  associée au Flt3-L.



## Conclusion générale

Durant ce travail de thèse, nous nous sommes attachés à mettre en exergue l'intérêt de la RIT  $\alpha$  au  $^{213}\text{Bi}$  et à valoriser cette nouvelle approche en tant que thérapie anticancéreuse. La première partie de notre travail a porté sur l'évaluation de la toxicité d'une administration intraveineuse de  $^{213}\text{Bi}$  couplé à la BSA. Ceci nous a permis de définir une activité injectée de  $^{213}\text{Bi}$  acceptable chez la souris : 3.7 MBq. En termes de survie, cette étude révèle une mort prématurée de l'ensemble des souris injectées avec une activité 11.1 MBq. Ce fort taux de mortalité peut être attribué à une toxicité, en particulier liée à une dysfonction hépatique, toutes ces souris présentant une augmentation de l'activité plasmatique des transaminases avant leur mort. L'injection intraveineuse de BSA couplée au  $^{213}\text{Bi}$  occasionne également une certaine toxicité rénale secondaire à long terme à l'activité injectée de 7.4 MBq. Les souris injectées avec une activité de 3.7 MBq ne présentent, en revanche, ni toxicité hépatique, ni toxicité rénale, ni toxicité hématologique irréversible. Au vu des données de survie, de poids corporel, de biochimie et d'histologie sur un long terme, il apparaît qu'une RIT avec le  $^{213}\text{Bi}$  est concevable, chez la souris, à une activité injectée de 3.7 MBq.

La deuxième partie de ce travail a consisté en l'évaluation d'une RIT  $\alpha$  utilisant le  $^{213}\text{Bi}$  et ciblant les cellules endothéliales tumorales. Le ciblage vasculaire en RIT  $\alpha$  permet de s'affranchir des problèmes rencontrés au cours de thérapies classiques :

- résistance aux chimiothérapies (génome stable des cellules endothéliales, moins sujettes aux mécanismes d'échappement),
- biodistribution tumorale adaptée à la courte période du  $^{213}\text{Bi}$  (45,6 minutes),
- accès facile des cellules endothéliales par voie sanguine,
- hétérogénéité antigénique tumorale.

L'étude immunohistochimique portant sur différents marquages vasculaires met en évidence l'hétérogénéité antigénique de l'endothélium vasculaire, dépendant à la fois du type de vaisseaux (artère, veine ou capillaire) et de la nature du tissu vascularisé (tissu normal ou tissu tumoral). Le CD31 est fortement exprimé par tous les types de vaisseaux (artère, veine et capillaire) dans la plupart des

organes examinés. Au sein des tissus tumoraux, quel que soit le type tumoral (cancer du colon MC38, myélome multiple 5T33 ou cancer du sein MDAMB468), le CD31 marque tous les types de vaisseaux avec une même intensité, que ces derniers soient situés en zone péri-tumorale ou en zone intratumorale. Le vWF est fortement exprimé au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux de gros calibre des organes normaux. Aucune expression du vWF n'est notée au sein des capillaires normaux ou tumoraux. Le CD105, quant à lui, est exprimé par les capillaires des tissus normaux (foie, moelle osseuse, rein) mais pas par les vaisseaux de plus gros diamètre. Au sein du tissu tumoral, il est fortement exprimé par les capillaires. Le CD105, présent au sein d'un grand nombre de cellules endothéliales de vaisseaux intratumoraux, est donc un marqueur plus spécifique et plus sensible des néocapillaires tumoraux que les marqueurs pan-endothéliaux classiques. Cette étude met en évidence l'hétérogénéité antigénique des cellules endothéliales et confirme la pertinence du ciblage du CD105 à visée thérapeutique.

L'étude de la biodistribution de l'anticorps MJ7/18 (anti-CD105 murin) montre une fixation précoce dans les poumons, le foie, les reins et la rate. La fixation au foie et à la rate est attribuée à une captation non spécifique par le système des phagocytes mononucléés hépatiques et spléniques. La biodistribution de l'anticorps à la tumeur est faible (3% de la dose injectée à 4 heures) mais reste stable jusqu'à 72h, contrairement aux autres organes où cette dernière diminue drastiquement au cours du temps. Ces résultats ne sont pas surprenants dans la mesure où ce sont les cellules endothéliales, et non les cellules tumorales qui sont ciblées par cet anticorps.

L'utilisation du MJ7/18 couplé au  $^{213}\text{Bi}$  nous a permis de constater une limitation de la croissance tumorale, suite à l'injection intraveineuse de 3.7 MBq de cet immunoconjugué. À cette activité injectée, l'effet obtenu avec le MJ7/18 est supérieur à celui observé avec un anticorps spécifique (B-B4) et non spécifique (OKT3) des cellules tumorales. Cette limitation de la croissance tumorale est également obtenue au cours d'une RIT fractionnée utilisant le MJ7/18 couplé à l' $^{211}\text{At}$ . Le ciblage du réseau vasculaire tumoral, associé à l'efficacité cytotoxique des particules  $\alpha$  permet donc de détruire les néocapillaires tumoraux, limitant ainsi la croissance tumorale.

La troisième partie de ce travail s'est attachée à stimuler le système immunitaire par le Flt3-L afin de potentialiser les effets immunitaires engendrés par la RIT  $\alpha$ . En effet, l'étude sur la toxicité du  $^{213}\text{Bi}$  menée dans la première partie de ce travail montre que les activités utilisées sont relativement faibles. Il nous a paru intéressant d'explorer alors d'autres mécanismes (notamment immunitaires), permettant d'augmenter l'efficacité de la RIT  $\alpha$ .

Nous avons démontré l'effet bénéfique de l'association RIT  $\alpha$  et Flt3-L sur la survie des souris dans un modèle syngénique immunocompétent de myélome multiple. Les mécanismes sous-tendant cet effet bénéfique apparaissent relativement complexes. L'absence de réponse antitumorale chez des souris ayant survécu à une première injection de 5T33 suivie d'une RIT  $\alpha$  (avec ou sans Flt3-L) et ayant reçu une deuxième injection de 5T33, évoque l'absence d'une réponse de type mémoire. L'augmentation du pourcentage des cellules NK lors de l'administration du Flt3-L à des souris greffées semblent aller dans le sens de l'implication des cellules NK. Il est également possible que l'effet bénéfique du Flt-3L lorsqu'il est associé à la RIT  $\alpha$  ne soit pas de nature immunologique mais plutôt lié à un effet direct du Flt3-L, en particulier un effet myéloprotecteur.

Quoi qu'il en soit, la stimulation du système immunitaire par le Flt3-L peut se révéler particulièrement adaptée chez des patients dont le système immunitaire est déjà déficient.



## Perspectives

Pour la première fois, notre étude consacrée à la toxicité des rayonnements  $\alpha$  a mis en évidence leur toxicité hépatique à long terme ainsi que l'absence de myélotoxicité. Ce profil de toxicité est profondément différent de celui des irradiations  $\beta$ , où la myélotoxicité est vraiment un facteur limitant [188, 201].

La RIT  $\alpha$  appliquée au ciblage des cellules endothéliales tumorales, par un anticorps ciblant le CD105, conduit au ralentissement de la croissance tumorale par un effet de ciblage spécifique de la vascularisation tumorale. Cependant, ce type de thérapie ne cible pas directement les cellules tumorales et pourrait prolonger l'état quiescent de métastases microscopiques [113]. Il apparaît donc nécessaire de la coupler avec d'autres thérapies plus agressives et plus ciblées sur des antigènes exprimés par les cellules tumorales. Cependant, l'obtention dans notre étude de tels résultats pour de faibles activités injectées n'engendrant aucune toxicité notable (hépatique, rénale ou hématologique) est très prometteur et permet d'envisager la combinaison du ciblage vasculaire en RIT  $\alpha$  à d'autres approches thérapeutiques.

La RIT  $\alpha$ , associée à un traitement par le Flt3-L, permet d'augmenter le taux de survie des souris greffées avec des cellules 5T33. Cet effet n'est pas imputable à une réponse de type mémoire (échec de survie chez les souris réinjectées avec des cellules 5T33). Des expériences, à base de déplétions sélectives en cellules NK, lymphocytes CD8<sup>+</sup> et lymphocytes CD4<sup>+</sup>, sont actuellement en cours.

Le coût élevé, la disponibilité limitée des radionucléides tels que le <sup>213</sup>Bi, la défiance vis-à-vis de radionucléides et l'optimisation de la chimie du couplage constituent les obstacles majeurs à la transposition de ces résultats prometteurs chez l'homme. Les difficultés techniques inhérentes à la manipulation des radionucléides et à la radioprotection limitent aujourd'hui le développement des protocoles de RIT en clinique. En raison des contraintes légales s'y rapportant, les installations susceptibles de recevoir et de développer ce type d'expérimentations demeurent peu nombreuses. Ces limites logistiques ne doivent en aucun cas remettre en cause l'intérêt de la RIT dans le cadre de thérapies anticancéreuses.



## Bibliographie

1. Akabani, G., Lendon, R., Bigner, D. D. & Zalutsky, M. R. Vascular targeted endoradiotherapy of tumors using alpha-particle-emitting compounds: theoretical analysis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **54**, 1259–1275 (2002).
2. Akagi, K. *et al.* Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the process of colorectal cancer development. *Surgery* **131**, S109–S113 (2002).
3. Alici, E., Konstantinidis, K. V, Aints, A., Dilber, M. S. & Abedi-Valugerdi, M. Visualization of 5T33 myeloma cells in the C57BL/KaLwRij mouse: establishment of a new syngeneic murine model of multiple myeloma. *Exp. Hematol.* **32**, 1064–1072 (2004).
4. Alici, E. *et al.* Anti-myeloma activity of endogenous and adoptively transferred activated natural killer cells in experimental multiple myeloma model. *Exp. Hematol.* **35**, 1839–46 (2007).
5. Antonysamy, M. A. & Thomson, A. W. Flt3 ligand (FL) and its influence on immune reactivity. *Cytokine* **12**, 87–100 (2000).
6. Apostolidis, C., Molinet, R., Rasmussen, G. & Morgenstern, A. Production of Ac-225 from Th-229 for Targeted alpha Therapy. *Anal. Chem.* **77**, 6288–6291 (2005).
7. Arthur, H. M. *et al.* Endoglin , an ancillary TGF beta receptor , is required for extra-embryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev. Biol.* **213**, 42–53 (2000).
8. Azuma, M. *et al.* The peptide sequence of diacyl lipopeptides determines dendritic cell TLR2-mediated NK activation. *PLoS One* **5**, 1-12 (2010).
9. Baluk, P., Morikawa, S., Haskell, A., Mancuso, M. & McDonald, D. M. Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am. J. Pathol. J. Pathol.* **163**, 1801–1815 (2003).
10. Baluk, P., Hashizume, H. & McDonald, D. M. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 102–111 (2005).
11. Banchereau, J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 767–811 (2000).
12. Barbet, J., Chérel, M. & Chatal, J.-F. Alpha particles more promising than toxins? *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **37**, 849–850 (2010).
13. Barlozzari, T., Reynolds, C. W. & Herberman, R. B. In vivo role of natural killer cells: involvement of large granular lymphocytes in the clearance of tumor cells in anti-asialo GM1-treated rats. *J. Immunol.* **131**, 1024–1027 (1983).

14. Bataille, R. & Harousseau, J.-L. Multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* **336**, 1657–1664 (1997).
15. Beck, R. *et al.* <sup>213</sup>Bi-radioimmunotherapy defeats early-stage disseminated gastric cancer in nude mice. *Cancer Sci.* **98**, 1215–1222 (2007).
16. Behr, T. M. *et al.* High-Linear Energy Transfer ( LET )  $\alpha$  versus Low-LET  $\beta$  Emitters in Radioimmunotherapy of Solid Tumors: Therapeutic Efficacy and Dose-limiting Toxicity of <sup>213</sup> Bi- versus <sup>90</sup> Y-labeled CO17-1A Fab ' Fragments in a Human Colonic Cancer Model. *Cancer Res.* **59**, 2635–2643 (1999).
17. Behrem, S., Zarkovic, K., Eskinja, N. & Jonjic, N. Endoglin is a better marker than CD31 in evaluation of angiogenesis in glioblastoma. *Croat. Med. J.* **46**, 417–422 (2005).
18. Bergh, J. *et al.* First-line treatment of advanced breast cancer with sunitinib in combination with docetaxel versus docetaxel alone: results of a prospective, randomized phase III study. *J. Clin. Oncol.* **30**, 921–929 (2012).
19. Bernabéu, C., Lopez-Novoa, J. M. & Quintanilla, M. The emerging role of TGF-  $\beta$  superfamily coreceptors in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**, 954–973 (2009).
20. Bethge, W. A. *et al.* Selective T-cell ablation with bismuth-213-labeled anti-TCR alpha beta as nonmyeloablative conditioning for allogeneic canine marrow transplantation. *Blood* **101**, 5068–75 (2003).
21. Bladé, J. *et al.* Soft-tissue plasmacytomas in multiple myeloma; incidence, mechanisms of extramedullary spread and treatment approach. *J. Clin. Oncol.* **29**, 3805–3812 (2011).
22. Blumenthal, G. M. *et al.* FDA approval summary: sunitinib for the treatment of progressive well-differentiated locally advanced or metastatic pancreatic neuroendocrine tumors. *Oncologist* **17**, 1108–1113 (2012).
23. Bourdeau, A., Dumont, D. J. & Letarte, M. A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J. Clin. Invest.* **104**, 1343–1351 (1999).
24. Bourke, V. A. *et al.* Spatial gradients of blood vessels and hematopoietic stem and progenitor cells within the marrow cavities of the human skeleton. *Blood* **114**, 4077–4080 (2009).
25. Braga, W. M. T., Atanackovic, D. & Colleoni, G. W. B. Review article the role of regulatory T cells and TH17 cells in multiple myeloma. *Clin. Dev. Immunol.* 4–7 (2012).
26. Brasel, K. *et al.* Hematologic effects of flt3 ligand in vivo in mice. *Blood* **6**, 2004–2012 (1996).
27. Brechbiel, M. W. Targeted  $\alpha$ -therapy: past, present, future? *Dalt. Trans.* **43**, 4918–4928 (2007).

28. Bredow, S., Lewin, M., Hofmann, B., Marecos, E. & Weissleder, R. Imaging of tumour neovasculature by targeting the TGF-beta binding receptor endoglin. *Eur. J. Cancer* **36**, 675–681 (2000).
29. Brekken, R. A., Li, C. & Kumar, S. Strategies for vascular targeting in tumors. *Int. J. Cancer* **100**, 123–130 (2002).
30. Bruix, J. *et al.* Efficacy and safety of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma: subanalyses of a phase III trial. *J. Hepatol.* **57**, 821–829 (2012).
31. Burke, P. A. & DeNardo, S. J. Antiangiogenic agents and their promising potential in combined therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **39**, 155–171 (2001).
32. Burri, P. H., Hlushchuk, R. & Djonov, V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev. Dyn.* **231**, 474–488 (2004).
33. Burrows, F. J., Watanabe, Y. & Thorpe, P. E. A murine model for antibody-directed targeting of vascular endothelial cells in solid tumors. *Cancer Res.* **52**, 5954–5962 (1992).
34. Burrows, F. J. *et al.* Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: Implications for diagnosis and therapy. *Clin. cancer Res.* **1**, 1623–1634 (1995).
35. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**, 298–307 (2011).
36. Chakravarty, P. K. *et al.* Flt3-ligand administration after radiation therapy prolongs survival in a murine model of metastatic lung cancer. *Cancer Res.* **59**, 6028–6032 (1999).
37. Cheifetz, S. *et al.* Endoglin is a component of the transforming growth factor beta receptor system in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 19027–19030 (1992).
38. Chen, K. *et al.* Antitumor activity and immunotherapeutic properties of Flt3-ligand in a murine breast cancer model. *Cancer Res.* **57**, 3511–3516 (1997).
39. Chérel, M. *et al.* <sup>213</sup>Bi Radioimmunotherapy with an anti-mCD138 monoclonal antibody in a murine model of multiple myeloma. *J. Nucl. Med.* **54**, 1597–604 (2013).
40. Chuang, H.-C. *et al.* High expression of CD105 as a prognostic predictor of early tongue cancer. *Laryngoscope* **116**, 1175–1179 (2006).
41. Ciavarra, R. P. *et al.* Flt3-ligand induces transient tumor regression in an ectopic treatment model of major histocompatibility complex-negative prostate cancer. *Cancer Res.* **60**, 2081–2084 (2000).
42. Cordier, D. *et al.* Targeted alpha-radionuclide therapy of functionally critically located gliomas with <sup>213</sup>Bi-DOTA-[Thi8, Met(O2)11]-substance P: a pilot trial. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **37**, 1335–1344 (2010).

43. Costello, B. *et al.* Perfusion of <sup>99</sup>Tcm-labeled CD105 Mab into kidney from patients with renal carcinoma suggests that CD105 is a promising vascular target. *Int. J. Cancer* **109**, 436–441 (2004).
44. Couturier, O. *et al.* Cancer radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **32**, 601–614 (2005).
45. Dadachova, E. *et al.* Evaluation of acute hematologic and long-term pulmonary toxicities of radioimmunotherapy of *Cryptococcus neoformans* infection in murine models. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1004–1006 (2004).
46. Dales, J.-P. *et al.* Long-term prognostic significance of neoangiogenesis in breast carcinomas: comparison of Tie-2/Tek, CD105, and CD31 immunocytochemical expression. *Hum. Pathol.* **35**, 176–183 (2004).
47. Dallas, N. A. *et al.* Endoglin ( CD105 ): A marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clin. Dev. Immunol.* **14**, 1931–1937 (2008).
48. De Fraipont, F., Nicholson, A. C., Feige, J.-J. & Van Meir, E. G. Thrombospondins and tumor angiogenesis. *Trends Mol. Med.* **7**, 401–407 (2001).
49. De Jong, M., Kwekkeboom, D., Valkema, R. & Krenning, E. P. Radiolabelled peptides for tumour therapy: current status and future directions. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **30**, 463–469 (2003).
50. Demaria, S. D. *et al.* Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **58**, 862–870 (2004).
51. Demaria, S. D., Bhardwaj, N., McBride, W. H. & Formenti, S. C. Combining radiotherapy and immunotherapy: a revived partnership. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **63**, 655–666 (2005).
52. Denekamp, J. Endothelial cell proliferation as a novel approach to targeting tumour therapy. *Br. J. Cancer* **45**, 136–139 (1982).
53. Dewan, M. Z. *et al.* Fractionated but not single dose radiotherapy induces an immune-mediated abscopal effect when combined with anti-CTLA-4 antibody. *Clin. Cancer Res.* **15**, 5379–5388 (2009).
54. Di Santo, J. P. & Vosshenrich, C. A. J. Bone marrow versus thymic pathways of natural killer cell development. *Immunol. Rev.* **214**, 35–46 (2006).
55. Dong, J., McPherson, C. M. & Stambrook, P. J. Flt-3 ligand: A potent dendritic cell stimulator and novel antitumor agent. *Cancer Biol. Ther.* **1**, 486–489 (2002).
56. Dons'koi, B. V, Chernyshov, V. P. & Osypchuk, D. V. Measurement of NK activity in whole blood by the CD69 up-regulation after co-incubation with K562 , comparison with NK cytotoxicity assays and CD107a degranulation assay. *J. Immunol. Methods* **372**, 187–195 (2011).

57. Dubinski, W. *et al.* Assessment of the prognostic significance of endoglin (CD105) in clear cell renal cell carcinoma using automated image analysis. *Hum. Pathol.* **43**, 1037–1043 (2012).
58. Duff, S. E., Li, C., Garland, J. M. & Kumar, S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J.* **17**, 984–992 (2003).
59. Ebbinghaus, S. *et al.* Phase 2 study of ABT-510 in patients with previously untreated advanced renal cell carcinoma. *Clin. cancer Res.* **13**, 6689–6695 (2007).
60. Eberlein, T. J., Rosenstein, M. & Rosenberg, S. A. Regression of a disseminated syngeneic solid tumor by systemic transfer of lymphoid cells expanded in interleukin 2. *J. Exp. Med.* **156**, 385–397 (1982).
61. Eichholz, A., Merchant, S. & Gaya, A. M. Anti-angiogenesis therapies: their potential in cancer management. *Onco. Targets. Ther.* **3**, 69–82 (2010).
62. Eidenschenk, C. *et al.* Flt3 permits survival during infection by rendering dendritic cells competent to activate NK cells. *PNAS* **107**, 9759–9764 (2010).
63. Engle, J. W. *et al.* Positron emission tomography imaging of tumor angiogenesis with a <sup>66</sup>Ga-labeled monoclonal antibody. *Mol. Pharm.* **9**, 1441–1448 (2013).
64. Erdem, O. *et al.* CD105 expression is an independent predictor of survival in patients with endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* **103**, 1007–1011 (2006).
65. Esche, C., Subbotin, V. M., Maliszewski, C. R., Lotze, M. T. & Shurin, M. R. FLT3 ligand administration inhibits tumor growth in murine melanoma and lymphoma. *Cancer Res.* **58**, 380–383 (1998).
66. Evans, J. D. *et al.* A phase II trial of marimastat in advanced pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* **85**, 1865–1870 (2001).
67. Favre-Felix, N. *et al.* Flt3 ligand lessens the growth of tumors obtained after colon cancer cell injection in rats but does not restore tumor-suppressed dendritic cell function. *Int. J. cancer* **86**, 827–834 (2000).
68. Fernandez, N. C. *et al.* Dendritic cells directly trigger NK cell functions: Cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat. med.* **5**, 405–411 (1999).
69. Flaherty, K. T. *et al.* Phase III trial of carboplatin and paclitaxel with or without sorafenib in metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **31**, 373–379 (2013).
70. Fliedner, T. M., Graessle, D., Paulsen, C. & Reimers, K. Structure and function of bone marrow hemopoiesis: mechanisms of response to ionizing radiation exposure. *Cancer Biother. Radiopharm.* **17**, 405–26 (2002).
71. Foley, E. J. Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res.* **13**, 835–837 (1953).

72. Fonsatti, E. *et al.* Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: In vivo evidence in a canine mammary carcinoma model. *Clin. Cancer Res.* **6**, 2037–2043 (2000).
73. Fonsatti, E., Altomonte, M., Nicotra, M. R., Natali, P. G. & Maio, M. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. *Oncogene* **22**, 6557–63 (2003).
74. Fonsatti, E., Nicolay, H. J. M., Altomonte, M., Covre, A. & Maio, M. Targeting cancer vasculature via endoglin/CD105: a novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours. *Cardiovasc. Res.* **86**, 12–19 (2010).
75. Fox, S. B., Gasparini, G. & Harris, A. L. Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. *Lancet Oncol.* **2**, 278–289 (2001).
76. Fox, S. B. & Harris, A. L. Histological quantitation of tumour angiogenesis. *APMIS* **112**, 413–430 (2004).
77. Ge, A.Z. & Butcher, E.C. Cloning and expression of a cDNA encoding mouse endoglin, an endothelial cell TGF-beta ligand. *Gene* **138**, 201–206 (1994).
78. Gerosa, F. *et al.* Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J. Exp. Med.* **195**, 327–33 (2002).
79. Ghiringhelli, F. *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J. Exp. Med.* **202**, 1075–1085 (2005).
80. Giavedoni, L. D., Velasquillo, M. C., Parodi, L. M., Hubbard, G. B. & Hodara, V. L. Cytokine expression, Natural Killer cell activation, and phenotypic changes in lymphoid cells from rhesus macaques during acute infection with pathogenic simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* **74**, 1648–1657 (2000).
81. Gonçalves, A. *et al.* BAYPAN study: a double-blind phase III randomized trial comparing gemcitabine plus sorafenib and gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer. *Ann. Oncol.* **23**, 2799–2805 (2012).
82. Gorski, D. H. *et al.* Potentiation of the antitumor effect of ionizing radiation by brief concomitant exposures to angiostatin. *Cancer Res.* **58**, 5686–5689 (1998).
83. Gorski, D. H. *et al.* Blockade of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res.* **59**, 3374–3378 (1999).
84. Gougos, A. & Letarte, M. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against pre-B leukemic cell line. *J. Immunol.* **141**, 1925–1933 (1988).

85. Gougos, A. & Letarte, M. Primary structure of endoglin , an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 8361–8364 (1990).
86. Guimond, M. *et al.* In vivo role of Flt3 ligand and dendritic cells in NK cell homeostasis. *J. Immunol.* **184**, 2769–2775 (2010).
87. Gupta, A. *et al.* Radiotherapy promotes tumor-specific effector CD8+ T Cells via dendritic cell activation. *J. Immunol.* **189**, 558–566 (2012).
88. Gutheil, J. C. *et al.* Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: A humanized monoclonal antibody to the integrin  $\alpha\beta 3$ . *Clin. cancer Res.* **6**, 3056–3061 (2000).
89. Gustafsson, A. M. E. *et al.* Comparison of therapeutic efficacy and biodistribution of 213 Bi- and At-labeled monoclonal antibody MX35 in an ovarian cancer model. *Nucl. Med. Biol.* **39**, 15–22 (2012).
90. Haruta, Y. & Seon, B. K. S. Distinct human leukemia-associated cell surface glycoprotein GP160 defined by monoclonal antibody SN6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 7898–902 (1986).
91. Hersey, P. *et al.* A randomized phase 2 study of etaracizumab, a monoclonal antibody against integrin  $\alpha(v)\beta(3)$ , + or - dacarbazine in patients with stage IV metastatic melanoma. *Cancer* **116**, 1526–1534 (2010).
92. Hida, K. *et al.* Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res.* **64**, 8249–8255 (2004).
93. Hobson, B. & Denekamp, J. Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br. J. Cancer* **49**, 405–413 (1984).
94. Hofmeister, V., Vetter, C., Schrama, D., Bröcker, E.-B. & Becker, J. C. Tumor stroma-associated antigens for anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **55**, 481–494 (2006).
95. Hong, H. *et al.* Positron emission tomography imaging of CD105 expression during tumour angiogenesis. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **38**, 1335–1343 (2011).
96. Hong, H. *et al.* Positron emission tomography imaging of CD105 expression with 89Zr-Df-TRC105. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **39**, 138–148 (2012).
97. Huchet, A. *et al.* Plasma Flt-3 ligand concentration correlated with radiation-induced bone marrow damage during local fractionated radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **57**, 508–515 (2003).
98. Humm, J. L. A microdosimetric model of astatine-211 labeled antibodies for radioimmunotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **13**(11), 1767-1773 (1987).
99. Hunder, N. N. *et al.* Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N. Engl. J. Med.* **358**, 2698–2703 (2008).

100. Huneke, R. B. *et al.* Effective alpha-particle-mediated radioimmunotherapy of murine leukemia. *Cancer Res.* **52**, 5818–5820 (1992).
101. Jaggi, J. S. *et al.* Renal tubulointerstitial changes after internal irradiation with alpha-particle-emitting actinium daughters. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 2677–2689 (2005).
102. Jain, R. K. Determinants of tumor Blood flow: A Review. *Cancer Res.* **48**, 2641–2658 (1988).
103. Janeway, C. A. Natural killer cells: A primitive immune system. *Nature* **341**, 108 (1989).
104. Jerkic, M. *et al.* Reduced angiogenic responses in adult endoglin heterozygous mice. *Cardiovasc. Res.* **69**, 845–54 (2006).
105. Jia, Q. *et al.* Dynamic contrast-enhanced MR imaging in a phase II study on neoadjuvant chemotherapy combining Rh-endostatin with docetaxel and epirubicin for locally advanced breast cancer. *Int. J. Med. Sci.* **10**, 110–118 (2013).
106. Jurcic, J. G. *et al.* Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. *Blood* **100**, 1233–1239 (2002).
107. Karam, J. A. *et al.* Use of preoperative plasma endoglin for prediction of lymph node metastasis in patients with clinically localized prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **14**, 1418–1422 (2007).
108. Kazeminezhad, B., Zare-Mirzaie, A., Mirafsharieh, A., Soleimantabar, H. & Zahedifard, S. Bilateral ovarian involvement: a rare presentation of disseminated multiple myeloma. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **39**, 446–449 (2013).
109. Kelly, M. P. *et al.* Radioimmunotherapy with alpha-particle-emitting <sup>213</sup>Bi-C-functionalized trans-cyclohexyl-diethylenetriaminepentaacetic acid-humanized 3S193 is enhanced by combination with paclitaxel chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **13**, 5604S–5612S (2007).
110. Kennel, S. J. & Mirzadeh, S. Vascular Targeted Radioimmunotherapy with <sup>213</sup>Bi - An  $\alpha$  Particle Emitter . *Science.* **25**, 241–246 (1998).
111. Kennel, S. J., Boll, R., Stabin, M., Schuller, H. M. & Mirzadeh, S. Radioimmunotherapy of micrometastases in lung with vascular targeted <sup>213</sup>Bi. *Br. J. Cancer* **80**, 175–184 (1999).
112. Kennel, S. J. *et al.* Therapy of rat tracheal carcinoma IC-12 in SCID mice: vascular targeting with [<sup>213</sup>Bi]-MAb TES-23. *Eur. J. Cancer* **38**, 1278–1287 (2002).
113. Kinuya, S. *et al.* Anti-angiogenic therapy and radioimmunotherapy in colon cancer xenografts. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **28**, 1306–1312 (2001).

114. Kneifel, S. *et al.* Local targeting of malignant gliomas by the diffusible peptidic vector 1,4,7,10-tetraazadodecane-1-glutaric acid-4,7,10-triacetic acid-substance P. *Clin. Cancer Res.* **12**, 3843–3850 (2006).
115. Kreiter, S. *et al.* FLT3 ligand enhances the cancer therapeutic potency of naked RNA vaccines. *Cancer Res.* **71**, 6132–6142 (2011).
116. Kumar, S. *et al.* Breast Carcinoma: Vascular Density Determined Using CD105 Antibody Correlates with Tumor Prognosis. *Cancer Res.* **50**, 856–861 (1999).
117. Kurup, A. *et al.* Recombinant human angiostatin (rhAngiostatin) in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a phase II study from Indiana University. *Ann. Oncol.* **17**, 97–103 (2006).
118. Kuzu, I. *et al.* Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumours. *J. Clin. Pathol.* **45**, 143–148 (1992).
119. Kyle, R. A. & Rajkumar, S. V. Multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* **351**, 1860–1973 (2004).
120. Kyle, R. A. & Rajkumar, S. V. Multiple myeloma. *Blood* **111**, 2962–2972 (2008).
121. Lee, C.-G. *et al.* Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment Augments Tumor Radiation Response under Normoxic or Hypoxic Conditions. *Cancer Res.* **60**, 5565–5570 (2000).
122. Li, C. *et al.* Both high intratumoral microvessel density determined using CD105 antibody and elevated plasma levels of CD105 in colorectal cancer patients correlate with poor prognosis. *Br. J. Cancer* **88**, 1424–1431 (2003).
123. Li, C. *et al.* CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells. *J. Cell Sci.* **116**, 2677–2685 (2003).
124. Li, D. Y. *et al.* Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science.* **284**, 1534–1537 (1999).
125. Li, J., He, M., Shen, B., Yuan, D. & Shao, C. Alpha particle-induced bystander effect is mediated by ROS via a p53-dependent SCO2 pathway in hepatoma cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 1–7 (2013).
126. Loisel, S. *et al.* Relevance, advantages and limitations of animal models used in the development of monoclonal antibodies for cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **62**, 34–42 (2007).
127. Lu, C. *et al.* Chemoradiotherapy with or without AE-941 in stage III non-small cell lung cancer: a randomized phase III trial. *J. Natl. Cancer Inst.* **102**, 859–865 (2010).
128. Lynch, D. H. *et al.* Flt3 ligand induces tumor regression and antitumor immune responses in vivo. *Nat. Med.* **3**, 625–631 (1997).

129. Mackarehtschian, K. *et al.* Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity* **3**, 147–161 (1995).
130. Manning, L. S. *et al.* A model of multiple myeloma: Culture of 5T33 murine myeloma cells and evaluation of tumorigenicity in the C57BL/ KaLwRij mouse. *Br. J. Cancer* **66**, 1088–1093 (1992).
131. Maraskovsky, E. *et al.* Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J. experimental Med.* **184**, 1953–1962 (1996).
132. Marioni, G. *et al.* Endoglin expression is associated with poor oncologic outcome in oral and oropharyngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol.* **126**, 633–639 (2006).
133. Marroquin, C. E. *et al.* Mobilization of dendritic cell precursors in patients with cancer by Flt3 ligand allows the generation of higher yields of cultured dendritic cells. *J. Immunother.* **25**, 278–288 (2002).
134. Massi, D. *et al.* Vasculogenic mimicry has no prognostic significance in pT3 and pT4 cutaneous melanoma. *Hum. Pathol.* **35**, 496–502 (2004).
135. Masurier, C. *et al.* Rôle des cellules dendritiques dans l'immunité innée antitumorale : vers de potentielles applications thérapeutiques en hématologie. *Hématologie*, **6**(3), 226–233 (2000).
136. Matsuno, F. *et al.* Induction of lasting complete regression of preformed distinct solid tumors by targeting the tumor vasculature using two new anti-endoglin monoclonal antibodies. *Clin. Cancer Res.* **5**, 371–382 (1999).
137. Mazon, J.-J. & Gerbaulet, A. The centenary of discovery of radium. *Radiother. Oncol.* **49**, 205–216 (1998).
138. McAllister, K. A. *et al.* Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat. Genet.* **8**, 345–351 (1994).
139. McBride, W.H. *et al.* A sense of danger from radiation. *Radiat. Res.* **162**(1), 1–19 (2004)
140. McDevitt, M. R. *et al.* Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur. J. Nucl. Med.* **25**, 1341–1351 (1998).
141. McDevitt, M. R. *et al.* An alpha-particle emitting antibody ([<sup>213</sup>Bi]J591) for radioimmunotherapy of prostate cancer. *Cancer Res.* **60**, 6095–6100 (2000).
142. McKenna, H. J. *et al.* Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* **95**, 3489–3497 (2000).
143. Merad, M., Sugie, T., Engleman, E. G. & Fong, L. In vivo manipulation of dendritic cells to induce therapeutic immunity I. *Blood* **99**, 1676–1682 (2002).

144. Michel, R. B. *et al.* Experimental therapy of disseminated B-Cell lymphoma xenografts with <sup>213</sup>Bi-labeled anti-CD74. *Nucl. Med. Biol.* **30**, 715–723 (2003).
145. Milenic, D. E. *et al.* Targeting of HER2 antigen for the treatment of disseminated peritoneal disease. *Clin. Cancer Res.* **10**, 7834–7841 (2004).
146. Miller, D. W. *et al.* Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int. J. Cancer* **81**, 568–572 (1999).
147. Minhajat, R. *et al.* Anti-CD105 inhibits primary cancer growth and secondary hematogenous metastasis in a xenograft model. *Vasc. Dis. Prev.* **6**, 91–96 (2009).
148. Mita, M.M. *et al.* A phase II, pharmacokinetic, and biologic study of semaxanib and thalidomide in patients with metastatic melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* **59**(2), 165-74 (2007).
149. Morikawa, S. *et al.* Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am. J. Pathol.* **160**, 985–1000 (2002).
150. Mulford, D. A., Scheinberg, D. A. & Jurcic, J. G. The promise of targeted alpha -particle therapy. *J. Nucl. Med.* **46**, 199S–204S (2005).
151. Munoz, R. *et al.* In vitro and in vivo effects of an anti-mouse endoglin (CD105)–immunotoxin on the early stages of mouse B16MEL4A5 melanoma tumours. *Cancer Immunol. Immunother.* **62**, 541–551 (2013).
152. Muranski, P. *et al.* Th17 cells are long-lived and retain a stem cell-like molecular signature. *Immunity* **35**, 972–985 (2011).
153. Nakamae, H. *et al.* Biodistributions, myelosuppression, and toxicities in mice treated with an anti-CD45 antibody labeled with the alpha-emitting radionuclides bismuth-213 or astatine-211. *Cancer Res.* **69**, 2408–2415 (2009).
154. Nagasawa, H. & Little, J. B. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of  $\alpha$  -particles. *Cancer Res.* **52**, 6394–6396 (1992).
155. Nikiteas, N. I. *et al.* Vascular endothelial growth factor and endoglin (CD-105) in gastric cancer. *Gastr cancer* **10**, 12–17 (2007).
156. Nikula, T. K. *et al.* A rapid, single vessel method for preparation of clinical grade ligand conjugated monoclonal antibodies. *Nucl. Med. Biol.* **22**, 387–390 (1995).
157. Nikula, T. K. *et al.* Alpha-emitting bismuth cyclohexylbenzyl DTPA constructs of recombinant humanized anti-CD33 antibodies: pharmacokinetics, bioactivity, toxicity and chemistry. *J. Nucl. Med.* **40**, 166–176 (1999).
158. Nilsson, S. K., Johnston, H. M. & Coverdale, J. A. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood* **97**, 2293–2299 (2001).

159. Norenberg, J. P. *et al.*  $^{213}\text{Bi}$ -[DOTA0, Tyr3]octreotide peptide receptor radionuclide therapy of pancreatic tumors in a preclinical animal model. *Clin. cancer Res.* **12**, 897–903 (2006).
160. O’Keeffe, M. *et al.* Dendritic cell precursor populations of mouse blood : identification of the murine homologues of human blood plasmacytoid pre-DC2 and CD11c+ DC1 precursors. *Blood* **101**, 1453–1459 (2003).
161. Onizuka, S. *et al.* Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor  $\alpha$ ) monoclonal antibody. *Cancer Res.* **59**, 3128–3133 (1999).
162. Park, S. I. *et al.* Conventional and pretargeted radioimmunotherapy using bismuth-213 to target and treat non-Hodgkin lymphomas expressing CD20: a preclinical model toward optimal consolidation therapy to eradicate minimal residual disease. *Blood* **116**, 4231–4239 (2010).
163. Pasmantier, M. P. & Azar, H. A. Extraskelatal spread in multiple plasma cell myeloma: a review of 57 autopsied cases. *Cancer* **23**, 167–174 (1968).
164. Pedley, B. *et al.* Synergy between vascular targeting agents and antibody-directed therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **54**, 1524–1531 (2002).
165. Pèlerin, A. *et al.* Immunociblage des tumeurs : situation et perspectives en 2000. *Bull. Cancer.* **87**(11), 777-791 (2000).
166. Perez-Gomez, E. *et al.* Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development. *Oncogene* **24**, 4450–4461 (2005).
167. Péron, J. M. *et al.* FLT3-ligand administration inhibits liver metastases: role of NK cells. *J. Immunol.* **161**, 6164–6170 (1998).
168. Pouget, J. & Mather, S. J. General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **28**, 541–561 (2001).
169. Prise, K. M., Belyakov, O. V, Folkard, M. & Michael, B. D. Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam. *Int. J. Radiat. Biol.* **74**, 793–798 (1998).
170. Qu, C. F. *et al.* Pre-clinical study of Bi labeled PAI2 for the control of micrometastatic pancreatic cancer. *Clin. Exp. Metastasis* **22**, 575–586 (2005).
171. Radl, J., Croese, J. W., Zurcher, C., Van den Enden-Vieveen, M. & De Leeuw, M. A. Animal model of human disease: Multiple myeloma. *Am. J. Pathol.* **132**, 593–597 (1988).
172. Raja, C. *et al.* Interim analysis of toxicity and response in phase 1 Trial of systemic targeted alpha therapy for metastatic melanoma. *Cancer Biol. Ther.* **6**, 846–852 (2007).
173. Ran, S. *et al.* Infarction of solid Hodgkin’s tumors in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. *Cancer Res.* **58**, 4646–4653 (1998).

174. Rizvi, S. M. A., Qu, C. F., Song, Y. J., Raja, C. & Allen, B. J. In vivo studies of pharmacokinetics and efficacy of bismuth-213 labeled antimelanoma monoclonal antibody 9.2.27. *Cancer Biol. Ther.* **4**, 763–768 (2005).
175. Rizvi, S. M. A. *et al.* Preclinical studies of bismuth-213 labeled plasminogen activator inhibitor type 2 (PAI2) in a prostate cancer nude mouse xenograft model. *Cancer Biol. Ther.* **5**, 386–393 (2006).
176. Roodink, I. & Leenders, W. P. J. Targeted therapies of cancer: angiogenesis inhibition seems not enough. *Cancer Lett.* **299**, 1–10 (2010).
177. Rosen, L. S. *et al.* A Phase 1 First-in-Human Study of TRC105 (Anti-Endoglin Antibody) in Patients with Advanced Cancer. *Clin. Cancer Res.* **18** (17), 4820-4829, (2012).
178. Rosenblat, T. L. *et al.* Sequential cytarabine and alpha-particle immunotherapy with bismuth-213-lintuzumab (HuM195) for acute myeloid leukemia. *Clin. Dev. Immunol.* **16**, 5303–5311 (2010).
179. Rousseaux, J. *et al.* Optimal conditions for the preparation of Fab and F(ab')<sub>2</sub> fragments from monoclonal IgG of different rat IgG subclasses. *J. Immunol. Meth.* **64**, 141-146 (1983).
180. Ruan, Q. *et al.* The Th17 immune response is controlled by the Rel–ROR gamma–ROR gamma T transcriptional axis. *J. Exp. Med.* **208**, 2321–2333 (2011).
181. Rutella, S. & Locatelli, F. Targeting multiple-myeloma-induced immune dysfunction to improve immunotherapy outcomes. *Clin. Dev. Immunol.* *1-13*, (2012).
182. Saad, R. S. *et al.* Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. *Mod. Pathol.* **17**, 197–203 (2004).
183. Salaun, P.-Y. *et al.* Toxicity and efficacy of combined radioimmunotherapy and bevacizumab in a mouse model of medullary thyroid carcinoma. *Cancer* 1053–1058 (2010).
184. Sandmaier, B. M. *et al.* Bismuth 213–labeled anti-CD45 radioimmunoconjugate to condition dogs for nonmyeloablative allogeneic marrow grafts. *Blood* **100**, 318–326 (2002).
185. Sarin, H. Physiologic upper limits of pore size of different blood capillary types and another perspective on the dual pore theory of microvascular permeability. *J. Angiogenes. Res.* **2**, 1-19 (2010).
186. Scagliotti, G. V *et al.* Sunitinib plus erlotinib versus placebo plus erlotinib in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial. *J. Clin. Oncol.* **30**, 2070–2078 (2012).
187. Scappaticci, F. A. Mechanisms and future directions for angiogenesis-based cancer therapies. *J. Clin. Oncol.* **20**, 3906–3927 (2002).

188. Seidl, C. *et al.*  $^{177}\text{Lu}$ -immunotherapy of experimental peritoneal carcinomatosis shows comparable effectiveness to  $^{213}\text{Bi}$ -immunotherapy, but causes toxicity not observed with  $^{213}\text{Bi}$ . *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **38**, 312–322 (2011).
189. Seon, B. K., Matsuno, F., Haruta, Y., Kondo, M. & Barcos, M. Long-lasting complete inhibition of human solid tumors in SCID mice by targeting endothelial cells of tumor vasculature with antihuman endoglin immunotoxin. *Clin. Cancer Res.* **3**, 1031–1044 (1997).
190. Seon, B. K. S. *et al.* Endoglin-targeted cancer therapy. *Curr. Drug Deliv.* **8**, 135–43 (2011).
191. Shaw, S. G., Maung, A. A., Steptoe, R. J., Thomson, A. W. & Vujanovic, N. L. Expansion of functional NK cells in multiple tissue compartments of mice treated with Flt3-ligand: implications for anti-cancer and anti-viral therapy. *J. Immunol.* **161**, 2817–2824 (1998).
192. Shurin, M. R. *et al.* FLT3 ligand induces the generation of functionally active dendritic cells in mice. *Cell. Immunol.* **179**, 174–184 (1997).
193. Silver, D. F., Hempling, R. E., Piver, M. S. & Repasky, E. A. Flt-3 ligand inhibits growth of human ovarian tumors engrafted in severe combined immunodeficient mice. *Gynecol. Oncol.* **77**, 377–382 (2000).
194. Smith, J. R., Thackray, A. M. & Bujdoso, R. Reduced herpes simplex virus type 1 latency in Flt-3 ligand-treated mice is associated with enhanced numbers of natural killer and dendritic cells. *Immunology* **102**, 352–358 (2001).
195. Song, E. Y. *et al.* Pharmacokinetics and toxicity of  $^{213}\text{Bi}$ -labeled PAI2 in preclinical targeted alpha therapy for Cancer. *Cancer Biol. Ther.* **6**, 898–904 (2007).
196. Song, E. Y. *et al.* Bismuth-213 radioimmunotherapy with C595 anti-MUC1 monoclonal antibody in an ovarian cancer ascites model. *Cancer Biol. Ther.* **7**, 76–80 (2008).
197. Song, H. *et al.* Radioimmunotherapy of breast cancer metastases with alpha-particle-emitter  $^{225}\text{Ac}$ : comparing efficacy with  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{90}\text{Y}$ . *Cancer Res.* **69**, 8941–8948 (2009).
198. Sproull, M., Avondoglio, D., Kramp, T., Shankavaram, U. & Camphausen, K. Correlation of plasma FL expression with bone marrow irradiation dose. *PLoS One* **8**, 1–7 (2013).
199. Stanford, K. I. *et al.* Syndecan-1 is the primary heparan sulfate proteoglycan mediating hepatic clearance of triglyceride-rich lipoproteins in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 3236–3245 (2009).
200. Supiot, S. *et al.* Comparison of the biologic effects of MA5 and B-B4 monoclonal antibody labeled with Iodine-131 and Bismuth-213 on multiple myeloma. *Cancer* **94**, 1202–1209 (2002).

201. Tabata, M., Kondo, M., Haruta, Y. & Seon, B. K. S. Antiangiogenic radioimmunotherapy of human solid tumors in SCID mice using <sup>125</sup>I-labeled anti-endoglin monoclonal antibodies. *Int. J. Cancer* **82**, 737–742 (1999).
202. Tahtis, K. & Bicknell, R. Tumor angiogenesis. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer, fourth edition, chap.17, Oxford University Press, 289–304 (2005).
203. Takahashi, N., Haba, A., Matsuno, F. & Seon, B. K. S. 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**, 7846–7854 (2001).
204. Takahashi, N. *et al.* 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**, 524–532 (2001).
205. Tammela, T. *et al.* Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature* **454**, 656–660 (2008).
206. Tanaka, F. *et al.* Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer : Comparison between anti-CD34 antibody and anti-CD105 antibody. *Clin. Cancer Res.* **7**, 3410–3415 (2001).
207. Ten Dijke, P., Goumans, M.-J. & Pardali, E. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* **11**, 79–89 (2008).
208. Teng, Y. H., Aquino, R. S. & Park, P. W. Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biol.* **31**, 3–16 (2012).
209. Thariat, J. & Boudabous, M. L'effet abscopal, synergie entre immunothérapie et radiothérapie. *Bull. Cancer* **100**, 1071 (2013).
210. Thorpe, P. E. & Burrows, F. J. Antibody-directed targeting of the vasculature of solid tumors. *Breast Cancer Res. Treat.* **36**, 237–251 (1995).
211. Tsirakis, G. *et al.* Clinical significance of sCD105 in angiogenesis and disease activity in multiple myeloma. *Eur. J. Intern. Med.* **23**, 368–373 (2012).
212. Tsujie, M., Uneda, S., Tsai, H. & Seon, B. K. S. Effective anti-angiogenic therapy of established tumors in mice by naked anti-human endoglin (CD105) antibody: differences in growth rate and therapeutic response between tumors growing at different sites. *Int. J. Oncol.* **29**, 1087–1094 (2006).
213. Tsujie, M. *et al.* Anti-tumor activity of an anti-endoglin monoclonal antibody is enhanced in immunocompetent mice. *Int. J. Cancer* **122**, 2266–2273 (2008).
214. Uneda, S. *et al.* Anti-endoglin monoclonal antibodies are effective for suppressing metastasis and the primary tumors by targeting tumor vasculature. *Int. J. Cancer* **125**, 1446–1453 (2009).

215. Vermeulen, P. B. *et al.* Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur. J. Cancer* **32A**, 2474–2484 (1996).
216. Vuillez, J.P. Le radioimmunociblage : aspects diagnostiques et thérapeutiques. *Bull. Cancer.* **87**(11):813-827 (2000).
217. Watchman, C. J. *et al.* Spatial distribution of blood vessels and CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells within the marrow cavities of human cancellous bone. *J. Nucl. Med.* **48**, 645–654 (2007).
218. Weidner, N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am. J. Pathol.* **147**, 9–19 (1995).
219. Weidner, N. Tumour vascularity and proliferation: clear evidence of a close relationship. *J. p* **189**, 297–299 (1999).
220. Wijdenes, J. *et al.* A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br. J. Haematol.* **94**, 318–323 (1996).
221. Wikström, P., Lissbrant, I. F., Stattin, P., Egevad, L. & Bergh, A. Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. *Prostate* **51**, 268–275 (2002).
222. Williams, N. S. *et al.* Generation of lytic Natural Killer 1.1+ , Ly-49- cells from multipotential murine bone marrow progenitors in a stroma-free culture: Definition of cytokine requirements and developmental intermediates. *J. Exp. Med.* **186**, 1609–1614 (1997).
223. Wodnar-Filipowicz, A. *et al.* Flt3 ligand level reflects hematopoietic progenitor cell function in aplastic anemia and chemotherapy-induced bone marrow aplasia. *Blood* **88**, 4493–4499 (1996).
224. Wodnar-Filipowicz, A. Flt3 ligand: role in control of hematopoietic and immune functions of the bone marrow. *News Physiol. Sci.* **18**, 247–251 (2003).
225. Wu, L. & Dakic, A. Development of dendritic cell system. *Cell. Mol. Immunol.* **1**, 112–118 (2004).
226. Yagasaki, H., Kawata, N., Takimoto, Y. & Nemoto, N. Histopathological analysis of angiogenic factors in renal cell carcinoma. *Int. J. Urol.* **10**, 220–227 (2003).
227. Yagmur, E. *et al.* Elevation of endoglin (CD105) concentrations in serum of patients with liver cirrhosis and carcinoma. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **19**(9), 755-761 (2007).
228. Yao, Z. *et al.* Pretargeted alpha emitting radioimmunotherapy using <sup>213</sup>Bi 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid-biotin. *Clin. Cancer Res.* **10**, 3137–3146 (2004).

229. Yao, Y., Kubota, T., Takeuchi, H. & Sato, K. Prognostic significance of microvessel density determined by an anti-CD105/endothelin monoclonal antibody in astrocytic tumors: comparison with an anti-CD31 monoclonal antibody. *Neuropathology* **25**, 201–206 (2005).
230. Zalutsky, M. R. & Pozzi, O. R. Radioimmunotherapy with alpha-particle emitting radionuclides. *Q. J. Nucl. Med. Mol. imaging* **48**, 289–296 (2004).
231. Zhang, M. *et al.* Pretargeting radioimmunotherapy of a murine model of adult T-cell leukemia with the alpha-emitting radionuclide, bismuth 213. *Blood* **100**, 208–216 (2002).
232. Zhong, Y., Zhang, J. & Huang, X. Multiple myeloma with rupture of ovarian plasmacytoma. *Chin. Med* **125**, 2948–2950 (2012).
233. Zhu, Y. *et al.* Hypoxic induction of endothelin via mitogen-activated protein kinases in mouse brain microvascular endothelial cells. *Stroke* **34**, 2483–2488 (2003).
234. Zijlmans, H. J. *et al.* Expression of endothelin (CD105) in cervical cancer. *Br. J. Cancer* **100**, 1617–1626 (2009).
235. Zou, W. Regulatory T cells , tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 295–307 (2006).

**RESUMÉ : Traitement des tumeurs solides par radioimmunothérapie alpha sur modèle murin : ciblage de l'angiogénèse et intérêt d'une immunostimulation**

La radiothérapie  $\alpha$  vectorisée utilise des particules  $\alpha$  de haute énergie cinétique, caractérisées par un transfert d'énergie linéique élevé, un parcours court et une forte cytotoxicité. Le  $^{213}\text{Bi}$  constitue un candidat attractif pour un ciblage vasculaire par radioimmunothérapie (RIT). Une étude préalable a permis de fixer une activité injectée acceptable de  $^{213}\text{Bi}$ , permettant une RIT sécurisée à 3,7 MBq chez la souris. Les avantages d'un ciblage vasculaire sont multiples. Pour détruire préférentiellement les vaisseaux de la néoangiogénèse tumorale, le choix de la cible est important. Au sein des tumeurs, la surexpression endothéliale du CD105 est corrélée à un pronostic péjoratif. Nous avons donc évalué la pertinence du ciblage du CD105 en RIT  $\alpha$ . La RIT utilisant un anticorps anti-CD105 murin couplé au  $^{213}\text{Bi}$  permet d'obtenir un ralentissement de la croissance tumorale. Nous avons ensuite investigué la modulation de la réponse immunitaire couplée à la RIT  $\alpha$  par des approches visant à stimuler la réponse antitumorale par le Flt3 ligand (Flt3L). La combinaison de la RIT et du traitement par le Flt3L s'avère plus efficace que l'un ou l'autre des traitements seuls. Cette augmentation de la survie n'est pas attribuable à une réponse impliquant les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Des études complémentaires, à l'aide de déplétions sélectives sont envisagées afin de déterminer la nature des cellules immunitaires responsables de l'augmentation de la survie lors de la combinaison de la RIT  $\alpha$  et du Flt3L. Ce travail permet de mettre en lumière l'intérêt de la RIT  $\alpha$  dans les thérapies anticancéreuses.

**Mots clés : radioimmunothérapie, bismuth 213, angiogénèse, Flt3 ligand, immunomodulation**

**RESUME: Treatment of solid tumours using alpha radioimmunotherapy on a mouse model: targeting angiogenesis and usefulness of an immunostimulation**

Alpha radiotherapy uses alpha particles, which are characterized by high lineic energy transfer, short path length and high cytotoxicity. 213-bismuth is an attractive candidate to target vasculature using radioimmunotherapy (RIT). A previous study has determined that an injected activity of 3.7 MBq of  $^{213}\text{Bi}$ , coupled with bovine serum albumin, was safe and non toxic in mice. The benefits of vascular targeting are numerous. In order to selectively destroy tumor blood vessels, the target choice is critical. In tumours, CD105 is overexpressed in endothelial cells and this is correlated with a poor prognosis. We evaluated the relevance of targeting CD105 using alpha RIT. RIT with an anti-CD105 antibody coupled with  $^{213}\text{Bi}$  induced a delay of the tumor growth. We then investigated immunostimulation with Flt3 ligand. A combination of RIT and Flt3 ligand treatment proved to be more effective than RIT alone or Flt3 ligand alone. This increased median of survival was not attributable to a CD8<sup>+</sup> T cell immune response. Further studies are planned to determine which immune cells are responsible for the increase of survival observed when RIT is associated with Flt3 ligand. These studies will use in vivo selective depletions using specific antibodies (anti-NK cells, anti-CD8<sup>+</sup> T cells, anti-CD4<sup>+</sup> T cells). This work highlights the interest of alpha radioimmunotherapy in cancer therapies.

**Key words: radioimmunotherapy, 213 bismuth, neo-vascularisation, Flt3 ligand, immunomodulation**

**COULAIS-DORSO Laëtitia  
La Chauffournaie  
49500 Chazé sur Argos**