

Année 2013

N° 13

Contribution à l'étude de la radiobiologie des  
émetteurs de particules alpha et de leur impact sur  
l'immunogénicité des tumeurs

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie

Spécialité : Cancérologie / Immunologie

*Présentée et soutenue publiquement par*

**Jean-Baptiste GORIN**

*Le 30 octobre 2013, devant le jury ci-dessous*

Rapporteurs : Dr. André PELEGRIN

Dr. Lionel APETOH

Examineur : Pr. Jean-Philippe VUILLEZ

Dr. Jacques BARBET

*Directeur de thèse : Dr. François DAVODEAU*

*Co-encadrante de thèse : Dr. Joëlle GASCHET*

## Remerciements

Merci à mes encadrants de thèse Joëlle Gaschet et François Davodeau pour leur accompagnement tout au long de ces trois années de thèse et pour leur aide lors de la rédaction. Je tiens en particulier à remercier Joëlle qui m'a formé au métier de chercheur et d'enseignant, qui m'a laissé gagner en autonomie tout en restant présente si j'en avais besoin. Merci pour m'avoir donné cette opportunité depuis le stage de master et jusqu'à aujourd'hui avec le poste d'ATER.

Je remercie Michel Chérel, Françoise Kraeber-Bodéré et Jacques Barbet de m'avoir accueilli au sein leur équipe de recherche.

Merci à Mich-mich pour toutes ses anecdotes et ses conversations toujours intéressantes qui animent chaque pause café.

Merci à Seb (aka mini-mich) pour toute son aide, tu m'as tout appris de la vie au labo et sans toi je ne serais rien...(faites semblant d'y croire, ça lui fera plaisir). Merci en particulier pour les longues journées d'élution, les weekends et les jours fériés passés au 7<sup>e</sup>.

Merci à Catherine Maurel et Sandrine Minault de leur aide précieuse pour le suivi des animaux.

Merci à Paul Pilet pour m'avoir initié au monde passionnant de la microscopie électronique.

Merci à Juliette pour son aide avec les divas. Quant aux Calibur c'est si simple qu'elle laisse faire.

Merci à Agnès, Pat et Sophie de s'assurer que je ne grille pas sur place au 7<sup>e</sup>.

Merci à Pat, Alain et à l'équipe des chimistes pour leur bonne humeur permanente toujours très appréciée.

Merci à Yannick de son aide pour l'ATER.

Merci à Charline pour son aide lors des 1<sup>ers</sup> générateurs.

Merci à Steph pour son dynamisme et son efficacité et à toute l'équipe du secrétariat.

Merci à Kamel pour sa ponctualité.

Merci à Jérémie, Etienne, Jb, Iza, Mathilde, Quentin pour tous les bon moments passé ensemble au sein de l'ADN et en dehors : journées de l'ED avec piscine, réunion de travail au verre bouteille, retraite scientifique au casino, séjour linguistique à Pragues, semaine de méditation à l'UCPA, brainstorming à Versailles, rencontres inter-labo chez Iza avec service de sécurité à la carabine...

Merci à tous les étudiants du labo pour la bonne ambiance générale et les services rendus les uns aux autres.

Merci à mes parents de m'avoir laissé libre de choisir le parcours qu'il me plaisait et de m'avoir toujours soutenu et encouragé dans mes études.

Merci à Lucile et à mes colocs de m'avoir supporté pendant la rédaction et de s'inquiéter régulièrement de ma santé mentale.

Merci aux nanards d'être toujours au rendez-vous pour se changer les idées lors de nos soirées lecture.

Merci à Swagg man.

## Résumé

La Radioimmunothérapie (RIT) est une thérapie vectorisée permettant l'irradiation ciblée de cellules tumorales. L'usage des émetteurs  $\alpha$  en RIT semble intéressant car le transfert d'énergie linéique élevé de ces particules et leur parcours limité dans les tissus est adapté au traitement de micrométastases ou de cancers disséminés. De plus, leur efficacité semble indépendante du débit de dose, de l'hypoxie tumorale ou de la distribution des cellules au sein du cycle cellulaire. En parallèle, un nombre croissant d'études montre que les rayonnements ionisants peuvent permettre le développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale par l'induction d'une mort cellulaire immunogène. Jusqu'à présent, peu d'études se sont intéressées aux mécanismes de mort cellulaire après irradiation  $\alpha$  et aucune information n'est disponible sur l'effet des  $\alpha$  sur l'immunité. Nous avons donc choisi d'étudier les mécanismes moléculaires de la réponse cellulaire et l'immunogénicité de cellules tumorales après irradiation par le bismuth-213 ( $^{213}\text{Bi}$ ). Nous avons montré que le  $^{213}\text{Bi}$  induit un blocage du cycle en G2, l'autophagie et la libération de DAMPs. Les cellules tumorales irradiées peuvent également induire l'activation de cellules dendritiques *in vitro*. De plus, la vaccination de souris immunocompétentes avec des cellules tumorales irradiées au  $^{213}\text{Bi}$  induit une protection anti-tumorale dépendante de lymphocytes T. Nos résultats montrent que l'irradiation  $\alpha$  peut stimuler l'immunité adaptative et induire une protection anti-tumorale efficace *in vivo*. Cette étude ouvre de nouvelles perspectives pour le développement de traitements combinatoires utilisant la RIT  $\alpha$  couplée à l'immunothérapie.

## Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>1</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>3</b>
<b>Table des illustrations</b> .....	<b>6</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>9</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>11</b>
<b>1. Le Cancer</b> .....	<b>11</b>
1.1. Généralités .....	11
1.2. Traitements actuels .....	15
<b>2. La radiothérapie</b> .....	<b>18</b>
2.1. Les rayonnements ionisants .....	18
2.2. Effets biologiques des radiations ionisantes .....	18
2.3. Les différents types de radiothérapies .....	20
2.3.1. Radiothérapie externe .....	20
2.3.1.1. Rayons X et gamma .....	20
2.3.1.2. Électrons .....	23
2.3.1.3. Neutrons .....	23
2.3.1.4. Hadronthérapie .....	24
2.3.2. Radiothérapie interne .....	26
2.3.2.1. Curiethérapie .....	26
2.3.2.2. Radiothérapies systémiques .....	26
<b>3. Radioimmunothérapie (RIT)</b> .....	<b>28</b>
3.1. Émetteurs $\beta$ .....	28
3.2. Électrons Auger .....	31
3.3. Émetteurs $\alpha$ .....	33
3.3.1. Radiobiologie des $\alpha$ .....	34
3.3.2. Études précliniques .....	36
3.3.3. Essais cliniques .....	37
<b>4. Implication du système immunitaire dans la réponse à l'irradiation</b> .....	<b>40</b>
4.1. Effet abscopal .....	40
4.2. Effets des rayonnements ionisants sur le système immunitaire .....	42
4.3. Effets des rayonnement ionisants sur l'immunogénicité des cellules tumorales .....	43
4.4. Mort cellulaire immunogène .....	44

4.4.1. Expression membranaire de Calréticuline .....	44
4.4.2. Autophagie et sécrétion d'ATP .....	45
4.4.3. Relargage de HMGB1 .....	46
<b>5. Objectifs de la thèse .....</b>	<b>48</b>
5.1. Radiobiologie des $\alpha$ dans le myélome multiple .....	48
5.2. L'irradiation $\alpha$ entraîne-t-elle une mort immunogène ? .....	49
<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>50</b>
<b>1. Lignées cellulaires, culture et traitements pharmacologiques .....</b>	<b>50</b>
<b>2. Irradiations au bismuth 213 (<math>^{213}\text{Bi}</math>).....</b>	<b>50</b>
<b>3. Irradiations aux UV .....</b>	<b>50</b>
<b>4. Mesure de la prolifération cellulaire par incorporation de thymidine tritiée (<math>^3\text{H}</math>-thymidine)</b> .....	<b>51</b>
<b>5. Analyse du cycle cellulaire.....</b>	<b>51</b>
<b>6. Western Blot .....</b>	<b>51</b>
6.1. Lysats cellulaires pour les WB $\gamma\text{H2AX}$ :.....	51
6.2. Lysats cellulaires pour WB LC3.....	51
6.3. Dosage protéique .....	52
6.4. Electrophorèse SDS-Page .....	52
6.5. Transfert.....	52
6.6. Révélation $\gamma\text{H2AX}$ .....	52
6.7. Révélation LC3B .....	53
<b>7. Test de clonogénicité .....</b>	<b>53</b>
<b>8. Mesure de la viabilité cellulaire par alamar Blue .....</b>	<b>53</b>
<b>9. Annexine V / 7-AAD.....</b>	<b>54</b>
<b>10. Analyse de la fragmentation de l'ADN.....</b>	<b>54</b>
<b>11. Détection de la Caspase 3 activée.....</b>	<b>54</b>
<b>12. Préparation des échantillons pour la microscopie électronique en transmission .....</b>	<b>54</b>
<b>13. Quantification des DAMPs.....</b>	<b>55</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>56</b>
<b>1. Radiobiologie des <math>\alpha</math> dans le myélome multiple .....</b>	<b>56</b>
1.1. Le bismuth-213 bloque la prolifération des lignées de myélome multiple.....	57
1.2. Analyse des mécanismes de mort cellulaire survenant après l'irradiation au $^{213}\text{Bi}$ .....	63
1.3. Analyse de l'autophagie après irradiation .....	67
1.4. Analyse de l'effet bystander après irradiation au $^{213}\text{Bi}$ .....	73
<b>2. Les <math>\alpha</math> : inducteurs de mort immunogène.....</b>	<b>75</b>
2.1. Article .....	75

2.2. Données supplémentaires .....	97
2.2.1. Effet du $^{213}\text{Bi}$ sur l'immunogénicité de MC-38 .....	97
2.2.2. Comparaison avec l'irradiation par rayon X.....	99
<b>Discussion.....</b>	<b>101</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>109</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>125</b>
1. Statistiques du cancer en Europe.....	125
2. Statistiques du myélome multiple en Europe .....	128
3. Schémas de désintégrations nucléaires.....	130
3.1. Émetteurs $\beta$ .....	130
3.2. Émetteurs Auger .....	131
3.3. Émetteurs $\alpha$ .....	131
4. Détail des émissions $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$ du $^{213}\text{Bi}$ et configuration électronique .....	133
4.1. Détails des émissions liées à la désintégration du $^{213}\text{Bi}$ .....	133
4.2. Configuration électronique du bismuth-213 .....	134

## Table des illustrations

Figure 1 : Estimation de l'incidence des cancers et de la mortalité en France en 2012.....	11
Figure 2 : La transformation tumorale, un processus de sélection darwinienne .....	12
Figure 3 : Les attributs majeurs des cellules cancéreuses .....	13
Figure 4 : « L'immunoediting » du cancer.....	14
Figure 5 : Mécanismes d'action du rituximab.....	17
Figure 6 : Les différents types de dommages à l'ADN et leurs mécanismes de réparation.....	20
Figure 7 : Principe de la radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité .....	21
Figure 8 : Déposition de l'énergie en fonction de la profondeur : courbe de Bragg.....	24
Figure 9 : Distribution de la dose pour un faisceau postérieur oblique de proton (gauche) ou de rayons X (droite) normalisés pour délivrer la même dose au centre de la zone cible (carré vert).....	25

Figure 10 : Principe de la RIT .....	27
Figure 11 : Diagramme de Segré.....	28
Figure 12 : Parcours d'une particule $\beta^-$ dans les tissus.....	29
Figure 13 : Effet de feux croisés et effet bystander sur une micrométastase .....	30
Figure 14 : Émission d'un électron Auger à la suite d'une capture électronique .....	32
Figure 15 : Évolution du TEL en fonction de la distance parcourue pour une particule $\alpha$ .....	34
Figure 16 : Répartition spatiale des ionisations au sein d'une molécule d'ADN pour une particule $\alpha$ , une particule $\beta$ et un émetteur d'électrons Auger .....	35
Figure 17 : Parcours d'une particule $\alpha$ dans les tissus .....	37
Figure 18 : Mécanisme de l'autophagie .....	45
Figure 19 : Mort cellulaire immunogène et induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale	47
Figure 20 : Structure du CHX-A'' DTPA (Brechtel 2008).....	56
Figure 21 : Schéma de désintégration de l'actinium-225.....	57
Figure 22 : Incorporation de $^3\text{H}$ -thymidine en fonction de l'activité de $^{213}\text{Bi}$ ajoutée aux cellules.....	58
Figure 23 : Diminution de la survie clonale après irradiation au $^{213}\text{Bi}$ .....	59
Figure 24 : Analyse du cycle cellulaire après irradiation au $^{213}\text{Bi}$ .....	61
Figure 25 : Induction de cassures double brin après irradiation .....	62
Figure 26 : Viabilité cellulaire après irradiation au $^{213}\text{Bi}$ .....	63
Figure 27 : Suivi de la mort cellulaire après irradiation au $^{213}\text{Bi}$ .....	64
Figure 28 : Électrophorèse de l'ADN génomique après irradiation au $^{213}\text{Bi}$ .....	66
Figure 29 : Pourcentage d'apoptose induite après irradiation par $^{213}\text{Bi}$ ou UV .....	67
Figure 30 : Augmentation de la quantité de LC3B-II après irradiation au $^{213}\text{Bi}$ .....	68
Figure 31 : Quantification densimétriques du signal LC3B-II.....	68

Figure 32: Identification des autophagosomes par microscopie électronique en transmission	69
Figure 33 : Identification des autophagosomes par microscopie électronique en transmission	70
Figure 34 : Impact de la 3-MA sur la prolifération cellulaire .....	71
Figure 35 : Impact de l'autophagie sur la prolifération cellulaire après irradiation au $^{213}\text{Bi}$ ...	72
Figure 36 : Impact de l'autophagie sur la survie clonale après irradiation au $^{213}\text{Bi}$ .....	73
Figure 37 : Analyse de l'effet bystander après irradiation au $^{213}\text{Bi}$ .....	74
Figure 38 : Augmentation de la quantité de LC3B-II après irradiation au $^{213}\text{Bi}$ .....	97
Figure 39 : Suivi de l'expression de calréticuline à la surface des cellules après irradiation au $^{213}\text{Bi}$ .....	98
Figure 40 : Suivi de la libération de DAMPs après irradiation aux rayons X.....	99
Figure 41 : La vaccination par des cellules irradiées aux rayons X induit une protection anti-tumorale de longue durée .....	100

## Liste des abréviations

3-MA : 3-méthyladénine

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ACE : Antigène Carcino-Embryonnaire

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

ATP : Adénosine TriPhosphate

BCA : Bicinchoninic Acid Assay

BSA : Bovine Serum Albumin

BMDC : Blood Marrow Dendritic Cell, cellules dendritiques issues de la moelle osseuse

CD : Cluster de différenciation

CHX-A''-DTPA : acide trans-cyclohexyldiethylenetriamine pentaacétique

CTLA-4 : Cytotoxic T Lymphocyte associated Antigen 4

DAMP : Danger Associated Molecular Pattern

DC : Cellule dendritique

EBR : Efficacité Biologique Relative

eV : électron Volt

FDA : Food and Drug Administration

Flt3-L : Fms-like tyrosine kinase 3 Ligand

GM-CSF : Granulocyte Macrophage - Colony stimulating Factor

HLA : Human Leukocyte Antigen

HMGB1 : High-Mobility Group Box 1

HRP : Horseradish Peroxydase

ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule 1

IFN : Interféron

IL : Interleukine

LC3B : microtubule associated Light Chain protein 3

NHEJ : Non Homologous End-Joining

NK : Natural Killer

NKG2D : Natural Killer Group 2 D

KO : Knock Out

PBS : Phosphate Buffered Saline

PSA : Prostate Specific Antigen

RIT : Radioimmunothérapie

TBS : Tris Buffered Saline

TEL : Transfert d'Énergie Linéique

TEP : Tomographie par Émission de Positrons

TGF- $\beta$  : Transforming Growth Factor- $\beta$

TLR : Toll-like Receptor

Treg : Lymphocyte T régulateur

# Introduction

## 1. Le Cancer

### 1.1. Généralités

Le cancer est la première cause de mortalité en France. Cette maladie non transmissible a tué plus de 7,6 millions d'individus dans le monde en 2008 ce qui représente 13% de la mortalité mondiale (<http://www.who.int>). En Europe, le nombre de décès causés par les néoplasmes est estimé à 1.262.433 en 2012 soit 20% des décès (<http://www.euro.who.int>). En France, la mortalité due au cancer représente 30% des décès avec 150.000 morts par an. En 2012, 371.676 nouveaux cas de cancer ont été enregistrés en France (<http://eco.iarc.fr/EUCAN>), les plus fréquents étant les cancers de la prostate, du sein, du poumon et les cancers colorectaux (Figure 1).

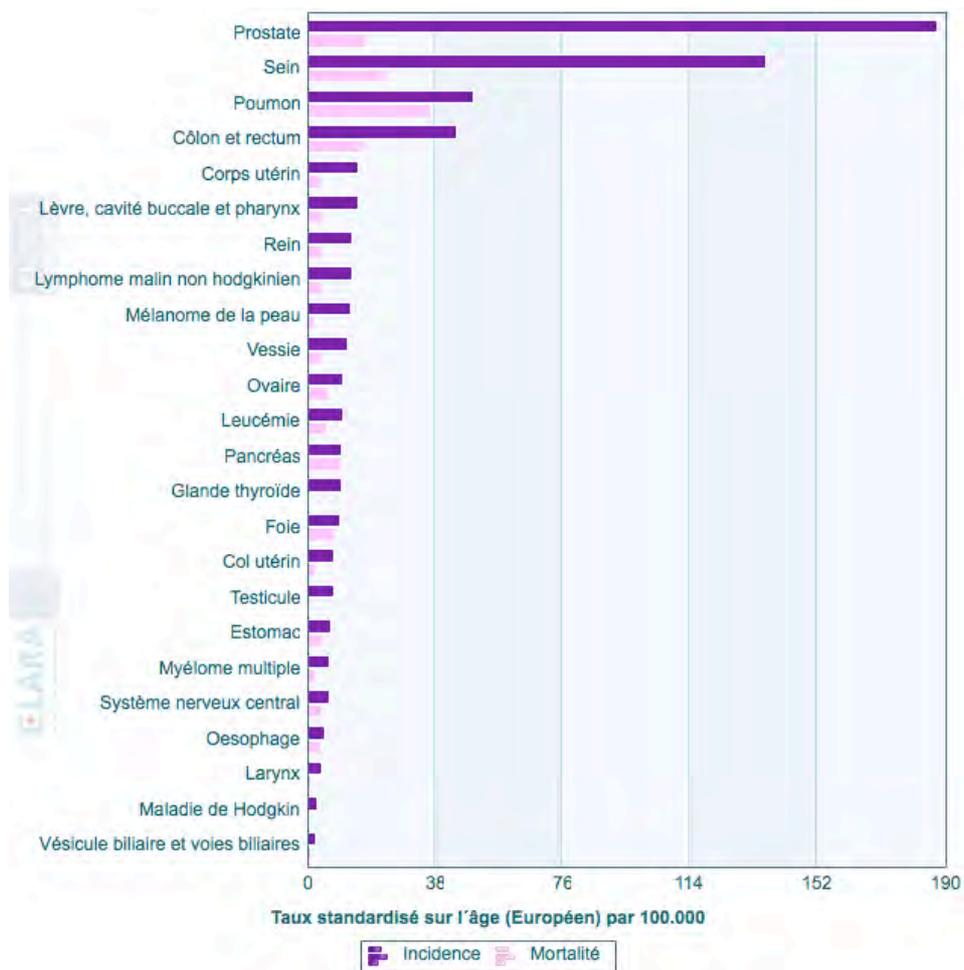


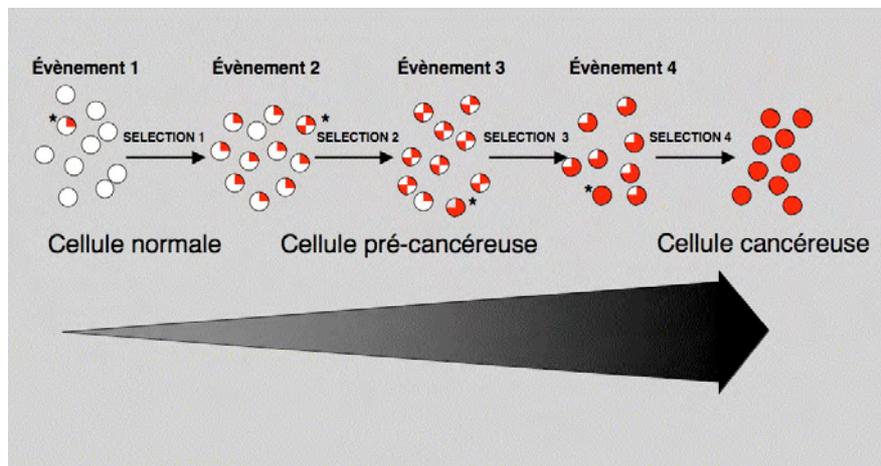
Figure 1 : Estimation de l'incidence des cancers et de la mortalité en France en 2012

Graphique obtenu sur le site <http://eco.iarc.fr/EUCAN>

La probabilité de développer un cancer avant l'âge de 85 ans est de 1 sur 2 pour les hommes et 1 sur 3 pour les femmes, cependant, grâce aux progrès de la recherche en oncologie, au développement de nouveaux traitements et à l'amélioration du diagnostic et de la prise en charge des cancers, plus de 60% des patients déclarant la maladie aujourd'hui pourront en guérir (<http://www.ligue-cancer.net>).

Le cancer est une maladie non transmissible définie par une prolifération cellulaire anormale et non contrôlée au sein d'un tissu normal de l'organisme. Au cours de l'évolution de la maladie, les cellules cancéreuses peuvent envahir les tissus voisins et migrer à des sites distants de l'organisme pour former des métastases. Les cellules cancéreuses dérivent d'une cellule ayant acquis de nouvelles caractéristiques au cours du processus de transformation tumorale qui leur permettent de se diviser indéfiniment, de manière incontrôlée et indépendante du tissu environnant.

La transformation tumorale est un phénomène progressif entraînant l'accumulation, par un processus de sélection darwinienne, de mutations fournissant un avantage prolifératif aux cellules tumorales (Figure 2). Les principaux attributs des cellules cancéreuses ont été décrits et répertoriés par Hanahan et Weinberg (Hanahan & Weinberg 2011; Hanahan & Weinberg 2000) (Figure 3).



**Figure 2 : La transformation tumorale, un processus de sélection darwinienne**



**Figure 3 : Les attributs majeurs des cellules cancéreuses**

Illustration issue de (Hanahan & Weinberg 2011). Copyright © Elsevier.

L'échappement au système immunitaire est l'une des caractéristiques tumorales les plus récemment ajoutée à la liste, mais c'est aussi l'une des plus intéressante. En effet, le système immunitaire joue un rôle majeur à la fois dans le contrôle et dans la progression tumorale : c'est la théorie des trois « E » de « l'immunoediting » introduite par l'équipe de Schreiber (Dunn et al. 2004; Schreiber et al. 2011).

Le phénomène d'immunoediting est composé de trois étapes séquentielles qualifiées de phase d'élimination, phase d'équilibre et phase d'échappement (Figure 4) (Vesely et al. 2011). La phase d'élimination correspond à la période durant laquelle les systèmes immunitaires inné et adaptatif détectent la présence de cellules tumorales émergentes et travaillent de concert à leur destruction. Les cellules NK et les lymphocytes T  $\gamma\delta$  peuvent détecter les cellules transformées et sécréter des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ). Ces cytokines permettent le développement de l'activité cytotoxique des macrophages qui vont participer, avec les cellules NK, à l'élimination des cellules tumorales. La destruction des cellules néoplasiques a pour conséquence la libération de signaux dangers capables d'activer les DC et d'antigènes de tumeurs dans le milieu extracellulaire. Les DC alors activées par ces signaux peuvent capturer les antigènes tumoraux libérés et les présenter sur

les CMH de classe I et II pour activer respectivement les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>. Les lymphocytes activés peuvent alors prendre part à l'élimination des cellules tumorales restantes. Cependant, il peut arriver que certaines cellules tumorales survivent à l'élimination et entrent alors en phase d'équilibre. Cette phase, supposée la plus longue, se caractérise par la mise en place d'un équilibre entre la prolifération des cellules tumorales et leur destruction par le système immunitaire. La pression de sélection constante exercée par le système immunitaire va favoriser l'émergence de clones plus résistants et/ou échappant à l'action des cellules du système immunitaire. De plus, l'inflammation chronique au niveau du site tumoral favorise le développement d'une tolérance immunitaire envers la tumeur et la réponse anti-tumorale va être inhibée, c'est la phase d'échappement. Les cellules tumorales sélectionnées vont alors pouvoir proliférer en dépit de l'action du système immunitaire et entraîner l'apparition d'une tumeur détectable.

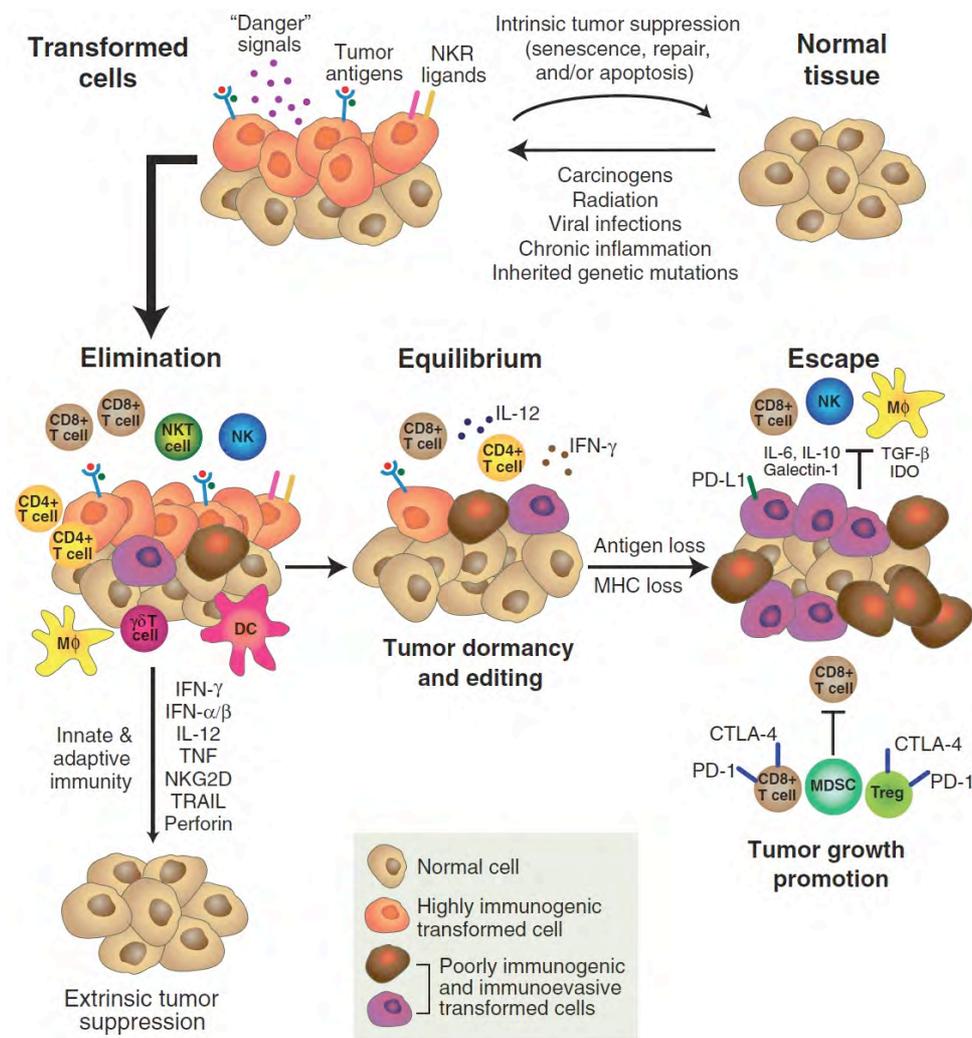


Figure 4 : « L'immunoediting » du cancer

Illustration issue de (Schreiber et al. 2011). Réutilisé sur permission de AAAS

## 1.2. Traitements actuels

De nombreux traitements sont aujourd'hui disponibles pour lutter contre le cancer. Selon le type et le stade d'avancement de la maladie, ces traitements vont pouvoir ralentir la progression tumorale, contrôler la maladie ou même éliminer le cancer.

La chirurgie est la plus ancienne forme de traitement contre le cancer et la plupart des patients subiront une intervention chirurgicale au cours de leur traitement. C'est aussi la modalité de traitement offrant la plus forte probabilité de guérison lorsque le cancer est encore localisé. Le but de la chirurgie est de retirer l'ensemble de la tumeur avec une marge de sécurité pour éviter les rechutes dues à des cellules tumorales résiduelles. Cependant, la santé du patient ne permet pas toujours une intervention chirurgicale. En outre, lorsque la maladie est disséminée, l'exérèse de la tumeur primaire n'est pas toujours possible et ne peut suffire à la guérison.

La chimiothérapie consiste en l'utilisation de médicaments interférant avec le métabolisme des cellules en division et donc des cellules tumorales. Ces molécules agissent de façon systémique et permettent donc le traitement de maladies disséminées, elles sont le plus souvent utilisées en complément de la chirurgie et/ou de la radiothérapie. Cependant, leur action systémique sur les cellules de l'organisme en prolifération (cellules souches hématopoïétiques, cellules intestinales) entraîne de nombreux effets secondaires indésirables tels que l'aplasie médullaire, nausée et vomissements, alopecie...

La radiothérapie est l'un des traitements du cancer les plus courants avec la chirurgie et la chimiothérapie. En effet, elle est recommandée pour plus de 53% des patients atteints de cancer en France ((Delaney et al. 2005); calcul basé sur l'incidence des cancers estimée en 2012 EUCAN). La radiothérapie peut être utilisée à but curatif ou en tant que traitement palliatif pour soulager des symptômes causés par le cancer, elle est aussi souvent associée à d'autres modalités de traitement comme la chirurgie ou la chimiothérapie. L'irradiation avant chirurgie (radiothérapie néo-adjuvante) a pour but de réduire le volume tumoral pour permettre une chirurgie moins importante, plus sûre et plus efficace. Cela peut permettre l'exérèse de tumeurs autrement trop volumineuses pour être opérées (cancer de la vessie, rectum, œsophage) ou de conserver des organes proches des tissus concernés (cordes vocales dans le cancer du larynx (Forastiere et al. 2003), sphincter anal dans le cancer du rectum). L'irradiation après chirurgie (radiothérapie adjuvante) vise à éliminer les cellules cancéreuses résiduelles. Dans le cancer du sein, cela permet d'éviter la mastectomie totale (Veronesi et al. 2002; Fisher et al. 2002). La radiothérapie est principalement utilisée pour le traitement de

cancers localisés, cependant, le développement de radiothérapies vectorisées permet désormais le traitement de maladies disséminées. C'est le cas des anticorps monoclonaux anti-CD20 couplé à l'yttrium-90 (<sup>90</sup>Y-Ibritumomab tiuxetan, Zevalin©) ou à l'iode-131 (<sup>131</sup>I-tositumomab, Bexxar©) utilisés dans le traitement des lymphomes non-Hodgkiniens.

L'immunothérapie consiste à combattre le cancer par le biais du système immunitaire (Mellman et al. 2011). Cependant, la transformation tumorale aboutit à la sélection de clones capables d'échapper à la réponse immune. Cet échappement est souvent lié à la mise en place d'une tolérance vis à vis de la tumeur (Dunn et al. 2002). L'immunothérapie vise donc à rétablir une réponse anti-tumorale efficace soit en stimulant l'immunité soit en inhibant la tolérance. L'immunothérapie dite « active » a pour but de stimuler le système immunitaire du patient par des techniques de vaccination anti-tumorale (H Yi & Appel 2013) ou par l'utilisation de cytokines stimulatrices tels que le GM-CSF, l'IFN- $\gamma$  ou différentes interleukines (Liao et al. 2013; Lizée et al. 2013). L'immunothérapie dite « passive » consiste en l'utilisation d'effecteurs de l'immunité produits ou amplifiés *ex vivo*. Il peut s'agir d'effecteurs moléculaires tels que les anticorps ou d'effecteurs cellulaires comme les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques d'antigènes tumoraux (transfert adoptif). Le transfert adoptif de lymphocytes T est relativement efficace dans le traitement de mélanomes métastatiques (Rosenberg et al. 2011) et de nombreuses études sont en cours pour optimiser ce type de traitement (Restifo et al. 2012). Les immunoglobulines, quant à elles, peuvent être utilisées pour obtenir un effet agoniste de voies stimulatrices du système immunitaire ou au contraire pour leur effet antagoniste sur des voies inhibitrices (Peggs et al. 2009). Notamment, le blocage de CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4) par l'anticorps Ipilimumab a démontré son efficacité en clinique et a récemment été approuvé aux États-Unis par la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement de mélanomes métastatiques. Récemment, d'autres anticorps ciblant la voie PD1/PD-L1 (programmed cell death protein 1) ont montré des résultats encourageants en clinique pour le traitements de cancers métastatiques, y compris pour des cancers considérés peu immunogènes (Sznol & Chen 2013) et l'association des anticorps anti-CTLA-4 et anti-PD-1 a montré un effet synergique dans un modèle préclinique (ASCO 2013 : (Selby et al. 2013)). Globalement le blocage de la tolérance semble être une approche thérapeutique prometteuse et le ciblage d'autres voies de signalisation sont actuellement à l'étude (Pardoll 2012). Enfin, les immunoglobulines peuvent induire directement ou indirectement la mort des cellules tumorales, c'est le cas par exemple de l'anticorps monoclonal rituximab, dirigé contre le CD20 qui fait référence dans le

traitement des lymphomes non Hodgkiniens. Cet anticorps peut en effet déclencher l'apoptose des cellules sur lesquelles il se fixe (Figure 5) mais il peut également entraîner la lyse des cellules cibles *via* le système du complément ou par l'intermédiaire de cellules effectrices de l'immunité (Smith 2003; Okroj et al. 2013). La régulation et l'importance relative de ces mécanismes *in vivo* sont encore mal connus mais leur élucidation représente un enjeu important pour le développement et l'optimisation des anticorps thérapeutiques.

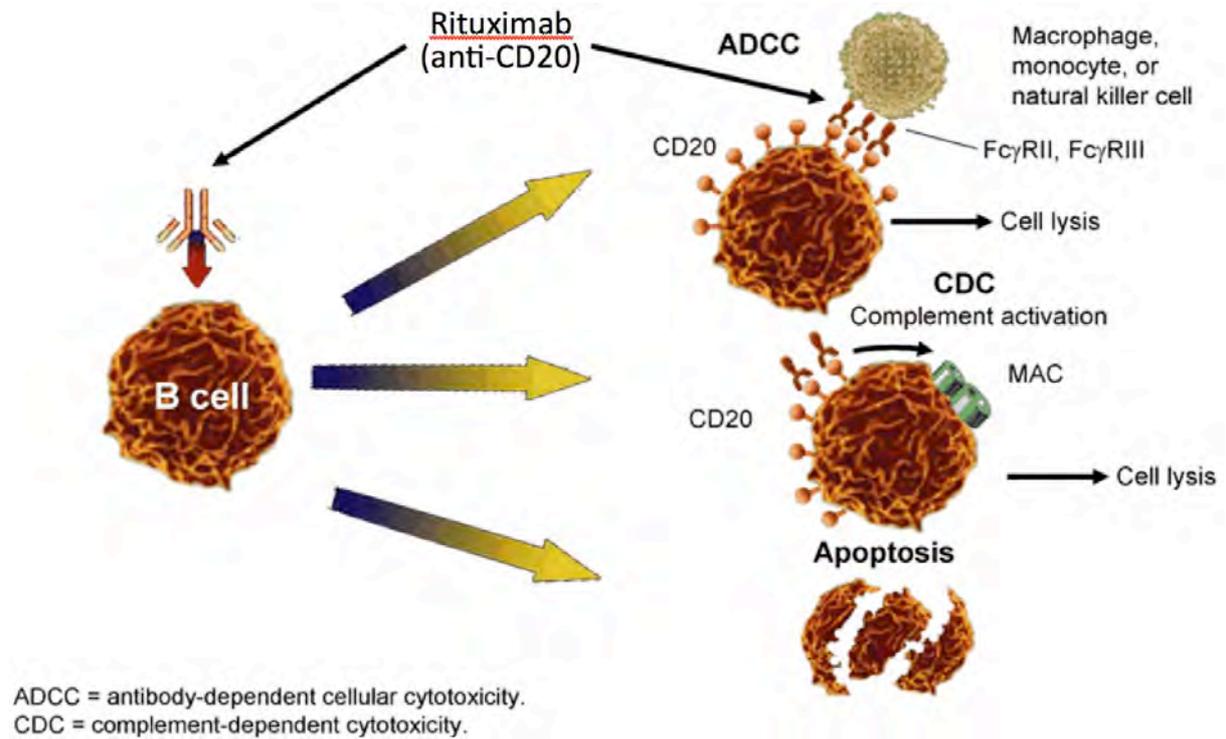


Figure 5 : Mécanismes d'action du rituximab

## 2. La radiothérapie

### 2.1. Les rayonnements ionisants

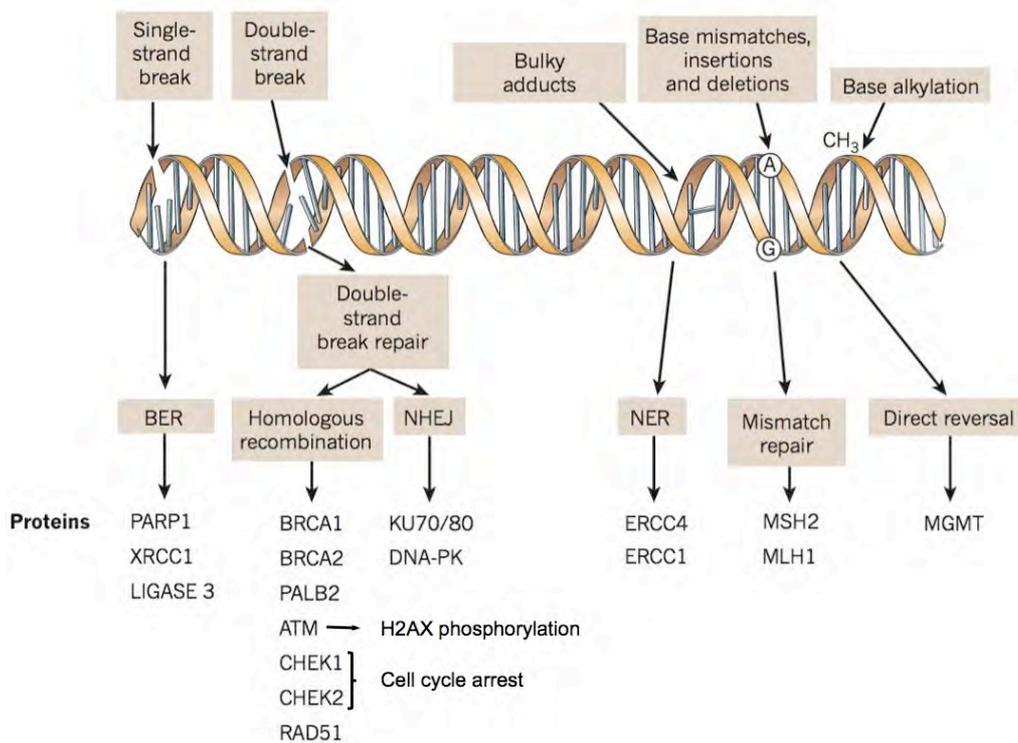
Le principe de la radiothérapie repose sur l'utilisation de rayonnements ionisants pour induire la mort des cellules cancéreuses. Les rayonnements ionisants sont des radiations de haute énergie capable d'entraîner l'ionisation de la matière qu'ils traversent. Ces rayonnements peuvent être de nature électromagnétique (photons), comme les rayons X et  $\gamma$ , ou particulaire, comme les électrons, les protons et les neutrons. L'énergie déposée au sein de la matière est quantifiée par la dose absorbée qui est exprimée en Gray (Gy). Une dose de 1 Gy correspond à une énergie de 1 Joule (J) absorbée dans 1 kg de matière. Dans le cas des particules ionisantes, le transfert d'énergie linéique (TEL) définit la quantité d'énergie déposée par unité de distance, exprimé en keV/ $\mu\text{m}$ . Cette caractéristique physique ainsi que la dose absorbée influencent grandement l'effet biologique des rayonnements ionisants sur les cellules.

### 2.2. Effets biologiques des radiations ionisantes

L'irradiation de cellules par des rayonnements ionisants provoque des dommages à l'ADN, aux lipides et aux protéines par interaction directe des rayonnements avec les molécules ou de manière indirecte, suite à la radiolyse de l'eau contenue dans les cellules. L'eau est en effet un constituant principal des cellules et sa radiolyse va entraîner la formation de radicaux libres hautement réactifs capable d'endommager les molécules avoisinantes. La radiolyse de l'eau en présence d'oxygène va également mener à la production de dérivés réactifs de l'oxygène très toxiques pour les cellules (Riley 1994).

Les effets des radiations ionisantes sur la survie cellulaire sont majoritairement dus aux dommages causés à l'ADN. Ces dommages peuvent être de différentes natures et chaque type de lésion peut être réparé par un mécanisme spécifique (Figure 6). Les modifications de bases, les pontages intra- ou inter-chaînes et les cassures simple brin de l'ADN sont facilement réparés et sont considérés comme des dommages sub-létaux, c'est-à-dire qu'une accumulation de plusieurs dommages de ce type au sein d'une même cellule est nécessaire pour entraîner la mort cellulaire. Les cassures double brin, en revanche, sont plus difficiles à réparer et sont souvent considérées comme les plus délétères (Jackson 2002). Les particules à faible TEL et les rayons X/ $\gamma$  produisent majoritairement des dommages sub-létaux alors que les particules à haut TEL causent plus de cassures double brin et surtout plus de regroupements complexes de lésions multiples lorsqu'elles traversent l'ADN (Goodhead 1999). Les cassures double brin sont détectées par la cellule et induisent la mise en place d'une machinerie moléculaire

complexe qui permet leur réparation soit par recombinaison homologue soit par NHEJ (Non homologous end-joining). Dans les deux cas, la protéine ATM (ataxia telangiectasia mutated) est recrutée et phosphoryle l'histone H2AX sur le résidu sérine 139 de son extrémité C-terminale. La protéine H2AX phosphorylée ( $\gamma$ H2AX) permet ensuite le recrutement des protéines nécessaires à la réparation de la lésion ainsi que des protéines capables de stopper la progression du cycle cellulaire (CHEK1 et CHEK2). On observe donc un arrêt en phase G2/M du cycle cellulaire après l'irradiation (Landsverk et al. 2011). Cet arrêt permet la mise en œuvre des mécanismes de réparation de l'ADN qui restaurent l'intégrité du matériel génétique des cellules irradiées. La plupart des dommages à l'ADN sont réparés par ces mécanismes très efficaces et très fidèles. Cependant, lorsque des dommages persistent ou sont incorrectement réparés, ils peuvent entraîner des anomalies chromosomiques, un arrêt définitif de la prolifération et la mort de la cellule (Hoeijmakers 2001). La sensibilité des cellules aux dommages liés à l'irradiation dépend aussi de la phase du cycle cellulaire où elles se trouvent, ainsi les cellules en phase G2 sont les plus radiosensibles (Sanford et al. 1986). De manière générale, les cellules en prolifération, et donc les cellules cancéreuses, sont plus sensibles aux effets des rayonnements ionisants que les cellules quiescentes (phase G0). L'objectif de la radiothérapie est d'utiliser les propriétés cytotoxiques des rayonnements ionisants pour détruire les cellules tumorales tout en limitant au maximum les effets toxiques sur les cellules saines.



**Figure 6 : Les différents types de dommages à l'ADN et leurs mécanismes de réparation**

BER : Base excision repair NER : Nucleotide excision repair NHEJ : Non homologous end-joining. Illustration adaptée de (Lord & Ashworth 2012). Copyright © Nature publishing group.

### 2.3. Les différents types de radiothérapies

On distingue la radiothérapie externe pour laquelle la source d'irradiation est située à distance du malade et la radiothérapie interne qui consiste à injecter des sources radioactives dans la circulation sanguine ou à les placer directement au contact des tissus tumoraux.

#### 2.3.1. Radiothérapie externe

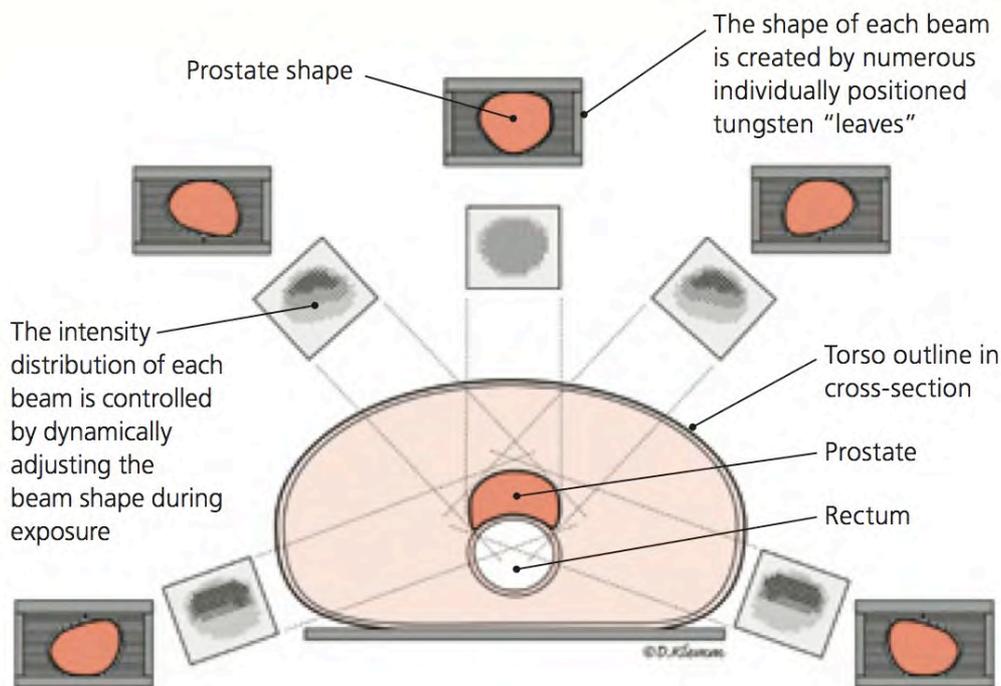
##### 2.3.1.1. Rayons X et gamma

Les rayons X et  $\gamma$  sont des rayonnements électromagnétiques. Ils sont de nature identique et ne diffèrent que par leur origine : les rayons  $\gamma$  sont produits au sein du noyau alors que les rayons X sont produits par des électrons. C'est le type de radiation le plus couramment utilisé en radiothérapie et leur efficacité a été démontrée dans le traitement de nombreux cancers. Ces rayonnements présentent de multiples avantages comme un coût relativement faible (Ringborg et al. 2003) et, comme toute technique de radiothérapie externe, une exposition aux radiations limitée à la séance de radiothérapie. Les patients ne sont donc pas radioactifs et le personnel médical est peu exposé aux radiations. L'inconvénient majeur est que les rayons X

et  $\gamma$  traversent tout le corps du patient, les tissus sains situés en avant et en arrière de la tumeur sur le trajet du faisceau sont donc aussi irradiés.

Pour limiter l'exposition des tissus sains, on utilise souvent plusieurs faisceaux de moindre intensité tous dirigés vers la tumeur. De cette manière la dose reçue par les tissus sur le trajet de chaque faisceau est diminuée alors que la dose totale délivrée à la tumeur reste la même. En revanche, le volume total de tissus sains irradié augmente avec le nombre de faisceaux.

L'évolution constante des techniques d'imagerie couplées à la radiothérapie (radiothérapie guidée par imagerie, tomothérapie, radiothérapie conformationnelle 3D) ainsi que la possibilité d'adapter la forme des faisceaux en fonction de la zone à irradier (radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité, Figure 7) permettent un ciblage toujours plus précis des zones tumorales de façon à limiter l'irradiation des tissus sains.



**Figure 7 : Principe de la radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité**

Afin de limiter l'irradiation d'organes critiques situés près de la tumeur, il est possible d'adapter la forme de chaque faisceau en fonction de l'angle d'incidence. La dose maximale pouvant être délivrée à la tumeur est ainsi augmentée. Illustration issue de (Gerber & Chan 2008). Copyright © American Academy of Family Physicians.

Malgré ces avancées techniques, la dose reçue par les tissus sains reste la limitation principale liée à l'utilisation des rayons X et  $\gamma$ . De plus, au sein des tumeurs solides, il existe souvent des

zones hypoxiques, or la toxicité des rayons X et  $\gamma$  dépend fortement de la présence d'oxygène (formation de dérivés réactifs de l'oxygène).

Pour pallier à ces problèmes, la radiothérapie est le plus souvent délivrée par doses fractionnées. Le fractionnement consiste à délivrer de faibles doses journalières d'environ 2 Gy, plusieurs fois par semaine et pendant plusieurs semaines. Cette méthode présente plusieurs avantages souvent décrits comme les 4 « R » de la radiobiologie (Withers 1999) :

- Réparation. Les cellules saines réparent plus efficacement les dommages sub-létaux que les cellules tumorales. En effet, elles prolifèrent moins et ont donc plus de temps pour réparer leur ADN. De plus, les cellules tumorales présentent souvent des mutations affectant les mécanismes de contrôle et de réparation de l'ADN. Le fractionnement laisse donc le temps aux cellules normales de remédier aux dommages subis alors que les cellules cancéreuses vont les accumuler.
- Redistribution. L'irradiation induit un blocage des cellules en phase G2 du cycle cellulaire des cellules en prolifération. Cette phase étant la plus radiosensible, le fractionnement permet d'optimiser l'effet cytotoxique de l'irradiation.
- Réoxygénation. L'irradiation détruit plus efficacement les cellules tumorales oxygénées. Une fois ces cellules tuées, l'oxygène va pouvoir circuler jusqu'aux zones hypoxiques et réoxygéner les cellules tumorales s'y trouvant. Ces cellules seront alors plus sensibles à l'irradiation lors des fractions suivantes.
- Repopulation. Suite à la destruction d'une partie des cellules tumorales, on observe souvent une augmentation de la prolifération des cellules résiduelles. Ces cellules souches tumorales sont quiescentes au début de la radiothérapie et donc moins sensibles à l'irradiation (Ogawa et al. 2013). Le fractionnement permet une irradiation plus efficace de ces cellules résiduelles lorsqu'elles recommencent à proliférer.

Le débit de dose (dose radioactive délivrée par unité de temps, exprimé en Gy/s) est aussi un paramètre important de l'irradiation avec les rayons X ou  $\gamma$ . En effet, ces rayons, tout comme les particules de faible TEL, engendrent une faible densité d'ionisation dans les tissus. Si le débit de dose est faible, la probabilité d'obtenir plusieurs lésions sub-létales simultanées au sein d'une même cellule est faible. Il est donc important que l'irradiation soit délivrée à haut débit de dose.

### 2.3.1.2. Électrons

Les faisceaux d'électrons sont principalement utilisés pour le traitement de cancers présentant des atteintes cutanées comme les lymphomes T cutanés, les sarcomes de Kaposi ou les cancers inflammatoires du sein (Diamantopoulos et al. 2011). Les électrons utilisés (4 à 25 MeV) pénètrent en effet peu dans les tissus (quelques centimètres au maximum) et n'engendrent donc pas d'irradiation des tissus sains au delà des zones ciblées. En revanche, la radiothérapie externe utilisant les électrons ne permet pas le traitement de tumeurs plus profondes.

### 2.3.1.3. Neutrons

Les neutrons sont des particules non chargées à très haut TEL, ce qui les rend très efficaces pour éliminer les cellules tumorales. En effet, les particules à haut TEL engendrent une forte densité d'ionisations au sein des cellules et causent plus de cassures double brin et des regroupements de lésions multiples dans l'ADN des cellules irradiées. Ces dommages complexes sont très efficaces pour entraîner la mort des cellules tumorales, et ce de façon indépendante de l'oxygénation ou de la phase du cycle cellulaire dans laquelle se situe la cellule (Barendsen & Broerse 1966). Il suffit que quelques neutrons traversent la cellule pour entraîner à coup sûr la mort cellulaire. La dose de neutrons nécessaire à la destruction tumorale est en moyenne 3 fois plus faible que la dose de rayons X requise pour obtenir le même effet biologique (Table 1 : Aspects comparatifs de différents rayonnements ionisants). L'efficacité biologique relative (EBR) des neutrons par rapport aux rayons X est donc élevée (EBR égal à 3 (Jones et al. 2009)).

	X-ray	Neutron	Proton	Helium ion	Carbon ion
Attenuation with depth	Pseudo-exponential	Pseudo-exponential	Bragg peak <sup>a</sup>	Bragg peak <sup>b</sup>	Bragg peak <sup>c</sup>
Integral biological dose	High	Highest	Low	Lower	Lowest
Average RBE	1	3	1.1	1.4	3
Oxygen modification factor	2.5	1.6-1.8	2.4	2.3	1.7

<sup>abc</sup>Refer to Bragg peak height where c>b>a.

**Table 1 : Aspects comparatifs de différents rayonnements ionisants**

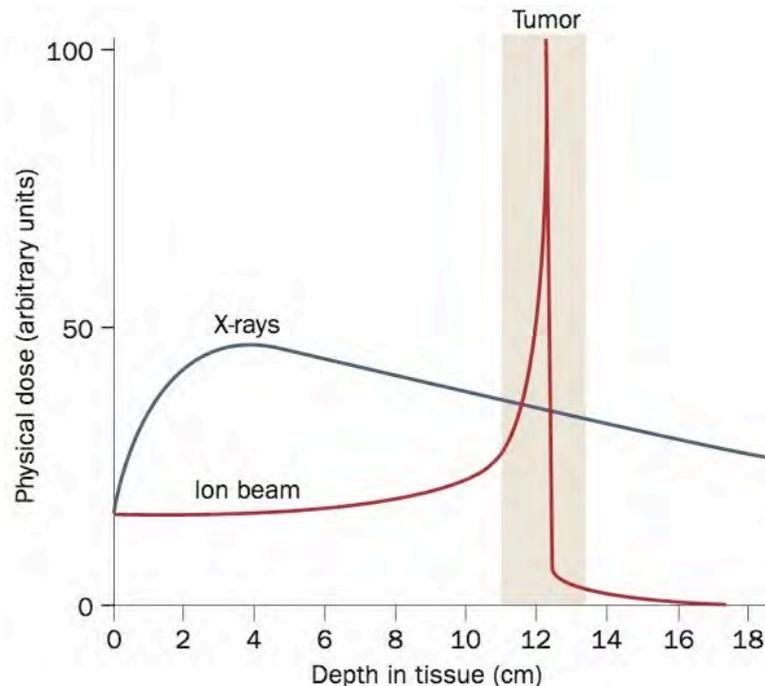
Table issue de (Jones et al. 2009). Copyright © Elsevier.

Malheureusement, les neutrons, à l'instar des rayons X et  $\gamma$ , traversent le corps entier et leur TEL élevé qui les rend attractifs pour l'élimination tumorale, les rend également plus toxiques envers les cellules saines. De plus, les dommages causés aux cellules par les neutrons étant presque systématiquement irréparables, le fractionnement ne permet pas de réduire la toxicité

aux tissus sains. Pour ces raisons, un ratio thérapeutique favorable entre les effets bénéfiques (destruction tumorale) et négatifs (toxicité) n'a pu être obtenu. Les essais cliniques réalisés n'ont pas montré d'avantage à l'utilisation des neutrons par rapport aux traitements conventionnels avec rayons X (Maucort-Boulch et al. 2010).

#### 2.3.1.4. Hadronthérapie

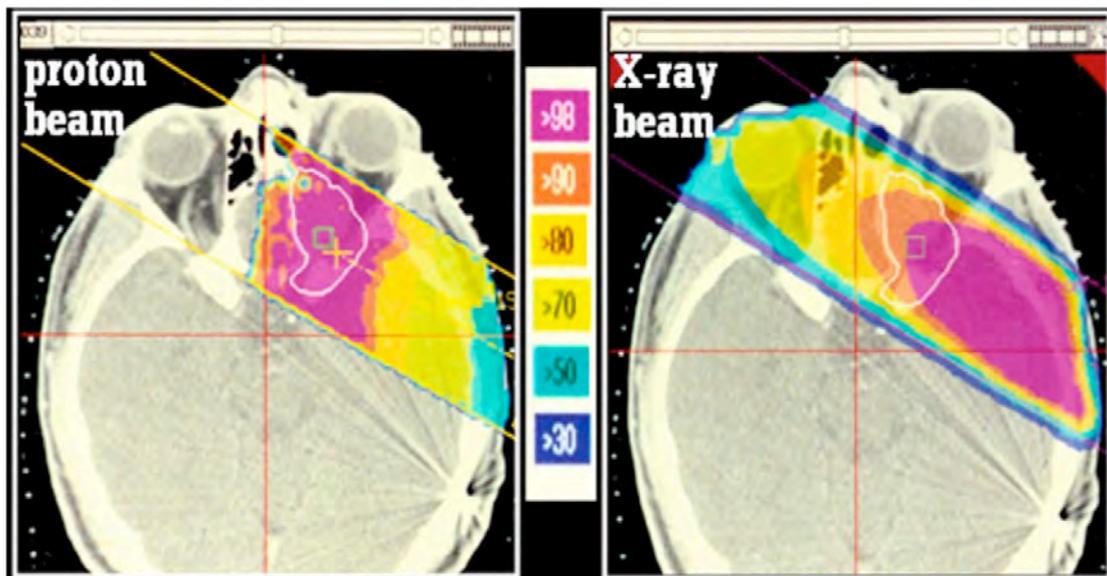
L'hadronthérapie est un domaine de la radiothérapie encore en développement. Hadron, du grec « hadros » qui signifie fort, désigne les particules lourdes telles que les protons ( $H^+$ ). Cette méthode consiste à utiliser des particules chargées comme les protons, les ions carbone ou les noyaux d'hélium (particule  $\alpha$ ) pour le traitement des cancers. Ces particules présentent deux avantages majeurs par rapport aux rayons X/ $\gamma$  et aux neutrons. D'une part, elles ne traversent pas tout le corps, et la profondeur qu'elles atteignent peut être choisie en adaptant leur vitesse initiale (et donc leur énergie). D'autre part, la distribution de l'énergie le long de leur trajet dans les tissus n'est pas décroissante avec la profondeur comme pour les rayons X/ $\gamma$  et les neutrons. Au contraire, la majeure partie de la dose est délivrée à la fin de leur parcours (Figure 8). Ce phénomène caractéristique des particules chargées est appelée « pic de Bragg » en hommage à William Henry Bragg qui l'a découvert en 1903.



**Figure 8 : Déposition de l'énergie en fonction de la profondeur : courbe de Bragg**

Graphique issu de (Durante & Loeffler 2009). Copyright © Nature publishing group.

De ces propriétés particulières découlent deux avantages théoriques des particules chargées. Non seulement leur parcours limité dans les tissus évite l'irradiation des tissus situés au delà de la tumeur, mais, la plus grande partie de la dose étant délivrée à la fin du parcours (i.e. dans la tumeur), les tissus situés en avant de la tumeur sont également moins exposés aux radiations (Figure 9). La dose déposée par les protons en dehors de la zone ciblée est ainsi 1,5 à 3 fois plus faible qu'avec des rayons X (Lomax et al. 1999).



**Figure 9 : Distribution de la dose pour un faisceau postérieur oblique de proton (gauche) ou de rayons X (droite) normalisés pour délivrer la même dose au centre de la zone cible (carré vert)**

On observe sur ces images une bien meilleure répartition de la dose avec le faisceau de protons. Les rayons X traversent tout le crâne et la dose déposée diminue exponentiellement avec la profondeur. On observe donc une forte irradiation avant la zone cible ainsi qu'une irradiation de l'œil situé après la tumeur. En revanche, avec le faisceau de proton, la majeure partie de la dose est déposée au niveau de la zone cible et les tissus situés au-delà ne subissent aucune irradiation. Illustration issue de (Michael Goitein 2010). Copyright © Elsevier.

Du fait d'un dépôt d'énergie variable avec la profondeur parcourue dans les tissus, le TEL des particules chargées varie également. Il est plus faible au début du parcours et augmente au niveau du pic de Bragg. L'irradiation est donc relativement moins toxique au niveau des tissus sains traversés et plus efficace dans la tumeur. De plus, un TEL élevé au niveau de la tumeur permet une irradiation efficace indépendamment de l'oxygénation de la tumeur, du débit de dose et de la distribution dans le cycle cellulaire (Okayasu 2011). Par exemple l'EBR d'un ion carbone en début de parcours est de l'ordre de 1 (effet similaire aux rayons X) et

atteint une EBR de 3-4 au niveau du pic de Bragg. Plus les ions utilisés ont une masse importante et plus leur TEL est élevé, ainsi, des particules plus lourdes que le carbone présentent un TEL élevé dès leur entrée dans les tissus ce qui pourrait entraîner une toxicité trop importante pour les tissus sains (Durante & Loeffler 2009). En résumé, pour une même dose à la tumeur, les particules chargées telles que les protons, les ions carbone ou tout autre ion de masse intermédiaire (de l'hélium au bore), engendrent un effet biologique plus important que les rayons X, tout en délivrant une dose significativement plus faible aux tissus sains. De multiples essais cliniques de phase I/II ont montré l'efficacité de l'hadronthérapie (Tsuji & Kamada 2012), en particulier dans le traitement de différents cancers de la tête et du cou (Schulz-Ertner et al. 2007). Cependant, pour la majorité des indications thérapeutiques, les preuves cliniques ne sont pas suffisantes pour démontrer avec certitude l'avantage des particules chargées (De Ruyscher et al. 2012). Ceci est en grande partie dû au manque d'essais cliniques randomisés de phase III comparant l'hadronthérapie à la radiothérapie conventionnelle aux rayons X. De plus, cette technologie étant bien plus coûteuse que la radiothérapie conventionnelle, peu de centres de traitement sont prêts à y mettre le prix tant que les avantages des protons ou des ions carbone n'auront été clairement démontrés.

### *2.3.2. Radiothérapie interne*

#### 2.3.2.1. Curiethérapie

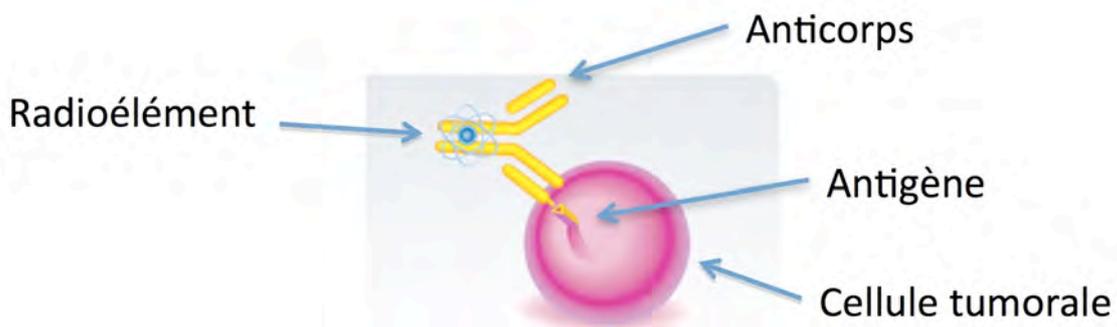
La curiethérapie (ou brachythérapie) consiste à placer une source radioactive directement dans ou au contact du tissu tumoral. Les radiations émises par les radio-isotopes utilisés ont une pénétration faible dans les tissus et n'irradient donc pas les tissus normaux au delà de la tumeur. De plus, la source étant placée dans la tumeur, elle reste idéalement placée même lorsque le patient bouge. La curiethérapie permet ainsi l'administration de fortes doses de radioactivité sans endommager les tissus sains. Cette technique est couramment utilisée pour le traitement des cancers cervicaux (Stewart & Viswanathan 2006), de la prostate (Langley et al. 2012), du sein (Hepel & Wazer 2012), de la peau (Murad et al. 2011) et peut être appliquée à bien d'autres cancers.

#### 2.3.2.2. Radiothérapies systémiques

Toutes les méthodes de radiothérapies passées en revue jusqu'ici visent principalement à traiter des cancers localisés et sont peu adaptées au traitement de maladies disséminées. Certains éléments chimiques possèdent une affinité naturelle pour un type cellulaire, l'iode,

par exemple s'accumule naturellement dans la thyroïde. Cette propriété a été mise à profit pour le traitement de certains cancers métastatiques : un radio-isotope de l'élément présentant une affinité naturelle pour le cancer en question est administré au patient par voie orale ou sanguine afin d'irradier spécifiquement les cellules tumorales disséminées dans le corps du malade. Ainsi, l'iode-131 est depuis longtemps utilisé pour traiter les cancers métastatiques de la thyroïde (Robbins et al. 2005). D'autres radioéléments, comme le strontium-89 et le samarium-153, présentent un tropisme pour les tissus osseux et sont utilisés à but palliatif pour réduire les douleurs liées au développement de métastases osseuses (Bauman et al. 2005).

Plus récemment, le développement de la radiothérapie interne vectorisée ou radioimmunothérapie (RIT) a ouvert de nouvelles perspectives pour le traitement des cancers disséminés. La RIT consiste à coupler un radioélément à un vecteur capable de se fixer spécifiquement sur les cellules tumorales (Figure 10). Le but de ce système est d'irradier spécifiquement les cellules cancéreuses disséminées dans l'organisme tout en évitant d'irradier les cellules saines. De nombreux vecteurs peuvent être utilisés pour le ciblage tumoral (peptides, fragments d'anticorps) mais les plus couramment utilisés sont les anticorps monoclonaux. De même, de nombreux radionucléides peuvent servir à l'irradiation. Ils sont généralement classés en fonction du principal type d'émission radioactive qu'ils produisent, on trouve les émetteurs de particules  $\alpha$ ,  $\beta$  et d'électrons Auger. Les caractéristiques de chacun de ces émetteurs radioactifs, ainsi que leurs applications dans le traitement antitumoral sont détaillées dans la partie suivante.



**Figure 10 : Principe de la RIT**

Copyright © Areva

### 3. Radioimmunothérapie (RIT)

#### 3.1. Émetteurs $\beta$

Les émetteurs  $\beta$  sont des isotopes radioactifs dont la désintégration entraîne l'émission de particules  $\beta^+$  (positron) ou  $\beta^-$  (néglatron). Seuls les émetteurs  $\beta^-$  sont utilisés pour la thérapie, les émetteurs  $\beta^+$  sont eux utilisés en imagerie médicale pour la tomographie par émission de positrons (TEP). L'émission  $\beta^-$  se produit lorsque le noyau est en excès de neutrons par rapport au nombre de protons (Figure 11). Pour rééquilibrer le noyau et se rapprocher de la zone de stabilité (formée par les nucléides stables), la transformation d'un neutron en proton a lieu. Cette transformation s'accompagne de l'émission d'un électron chargé négativement, ou particule  $\beta^-$ , selon la formule suivante :

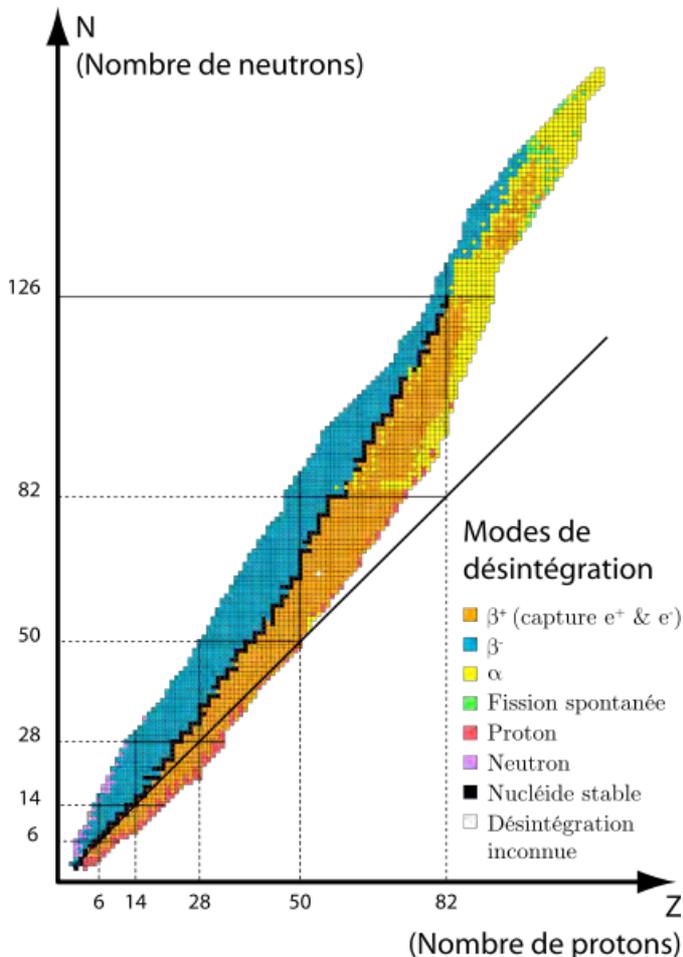
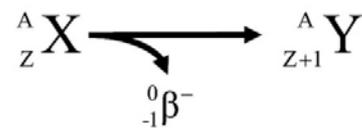
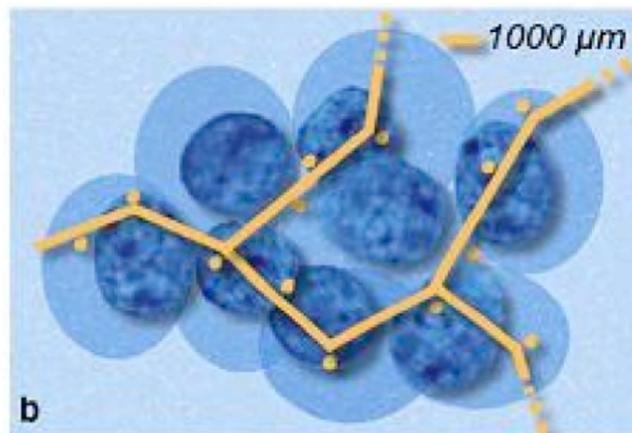


Figure 11 : Diagramme de Segré

La quantité relative de neutrons par rapport au nombre de proton influence le type de désintégration subie par les radio-isotopes. Un excès de neutrons, entraîne une émission  $\beta^-$  alors qu'un radio-isotope contenant un trop grand nombre de nucléons émettra une particule  $\alpha$ .

Chaque désintégration donne lieu à un électron dont l'énergie varie de 0 à un maximum spécifique de chaque radio-isotope. La distance parcourue par l'électron dans les tissus est dépendante de son énergie : plus l'énergie est grande, plus son trajet sera long. Les électrons ayant une masse très faible, leur trajectoire est défléchie par les interactions avec la matière et leur parcours n'est donc pas linéaire (Figure 12). Les émetteurs  $\beta$  utilisés pour la RIT émettent des électrons d'énergie moyenne comprise entre 50 et 2300 keV pour un parcours dans les tissus variant de 0,05 à 12 mm. Ces radiations présentent donc un TEL très faible de l'ordre de 0,2 keV/ $\mu\text{m}$ .

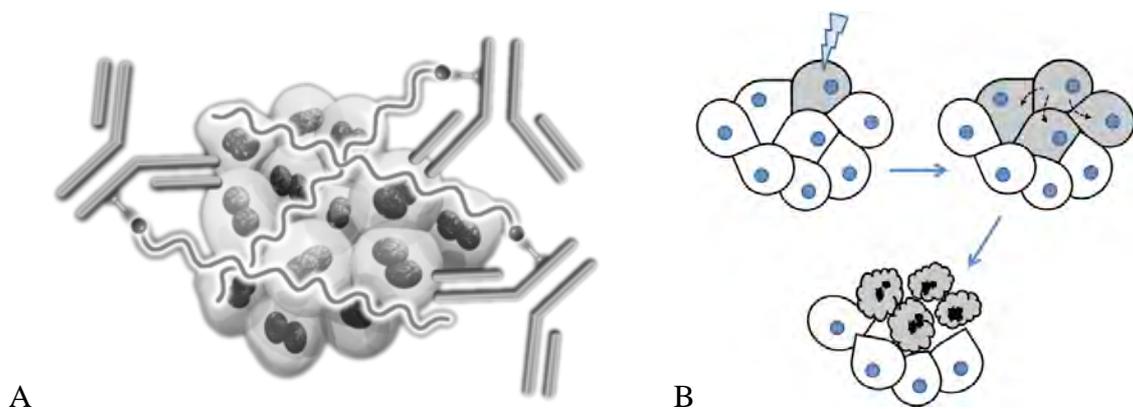


**Figure 12 : Parcours d'une particule  $\beta^-$  dans les tissus**

Représentation schématique du trajet d'une particule  $\beta$  au travers de cellules tumorales. Les étoiles représentent les dépôts d'énergie entraînant l'ionisation de la matière. Illustration issue de (Couturier et al. 2005). Copyright © Springer.

Les deux seuls traitements de radioimmunothérapie homologués par la FDA à ce jour utilisent des émetteurs  $\beta^-$ . Il s'agit d'anticorps monoclonaux anti-CD20 couplés à l'yttrium-90 ( $^{90}\text{Y}$ -Ibritumomab tiuxetan, Zevalin©) et à l'iode-131 ( $^{131}\text{I}$ -tositumomab, Bexxar©) utilisés dans le traitement des lymphomes non Hodgkiniens. Les lymphomes étant des cancers disséminés, la RIT est tout à fait indiquée pour leur traitement et différents essais cliniques ont démontré son efficacité (Witzig 2002; Kaminski et al. 2005). De nombreux autres essais cliniques ont déjà eu lieu et sont encore en cours pour tester l'efficacité de la RIT dans le traitement de cancers hématologiques (Pagel et al. 2009; Lindén et al. 2005; Rose et al. 2012) et de cancers métastatiques (Kramer et al. 2007; Gulenchyn et al. 2012), notre groupe a notamment obtenu des résultats significatifs dans le traitement de cancer médullaires de la thyroïde avec la RIT (Chatal 2006; Kraeber-Bodéré et al. 2010). L'utilisation de la RIT est également testée pour le traitement de certains cancers solides (Tomblyn et al. 2013). En effet, le trajet relativement

long des électrons dans les tissus permet à la RIT  $\beta$  d'irradier des cellules tumorales situées au sein d'une petite tumeur solide même si elles ne sont pas directement accessibles aux anticorps, c'est ce que l'on appelle l'effet de « feu croisé » (Figure 13). Il arrive que certaines cellules d'une tumeur n'expriment pas ou peu l'antigène ciblé par l'anticorps, ces cellules ne sont donc pas directement ciblées par la RIT et peuvent échapper à l'irradiation. Les feux croisés permettent l'irradiation de ces cellules et permettent donc de réduire l'effet de l'hétérogénéité du ciblage tumoral souvent néfaste à l'efficacité de la RIT (Kassis 2008). En plus du feu croisé, l'effet bystander peut également contribuer à l'élimination des cellules tumorales non ciblées par la RIT (Figure 13). L'effet bystander correspond aux effets biologiques observés sur des cellules n'ayant pas été touchées par l'irradiation tels que l'induction de dommages à l'ADN et la mort cellulaire. Ces effets peuvent être transmis aux cellules voisines des cellules irradiées par des jonctions communicantes inter-cellulaires ou par des facteurs sécrétés dans le milieu extracellulaire. La nature de ces facteurs sécrétés ou transmis par les jonctions communicantes n'est à ce jour pas encore caractérisée (Morgan 2003; Mothersill & Seymour 2004).



**Figure 13 : Effet de feu croisé et effet bystander sur une micrométastase**

A, Le feu croisé des émetteurs  $\beta$ - permet l'irradiation des cellules situées au centre de la tumeur sur lesquelles les anticorps n'ont pas pu se fixer. B, L'effet bystander entraîne la mort de cellules non touchées par l'irradiation se trouvant à proximité de la cellule irradiée. Illustration issue de (Kandouz 2011).

Cependant le TEL des particules  $\beta$ - est très bas ( $\sim 0,2$  keV/ $\mu\text{m}$ ) et le débit de dose de la RIT est généralement très faible. En effet, la dose est délivrée petit à petit, tout au long de la décroissance radioactive, le débit est donc dépendant de la demi-vie de l'isotope utilisé et diminue exponentiellement avec le temps. Ceci peut encore être accentué par la faible vitesse

de biodistribution des anticorps puisque le pic d'accumulation à la tumeur d'un anticorps complet peut prendre jusqu'à 1 à 2 jours dans le cas de tumeurs solides, une partie importante de l'énergie radioactive est donc délivrée avant d'atteindre la tumeur qui ne reçoit souvent que <0,01% de la dose injectée par gramme de tumeur (Sharkey & Goldenberg 2006). Pour ces raisons, le nombre de particules nécessaires à la destruction de chaque cellule tumorale est considérable et atteint plusieurs milliers de désintégration par cellule (Humm & Cobb 1990). La quantité de radionucléides nécessaire à la stérilisation complète de la tumeur est donc très élevée. Or, du fait de la portée relativement longue des  $\beta^-$  et du temps de résidence important des anticorps dans le sang, la moelle osseuse reçoit une partie importante de l'irradiation. La dose maximale injectable est donc limitée par la toxicité médullaire et il est presque impossible d'atteindre la dose nécessaire à l'élimination complète des cellules tumorales. Ceci est encore plus marqué dans le cas de tumeurs solides présentant des zones hypoxiques qui sont encore plus résistantes à l'effet des particules de faible TEL.

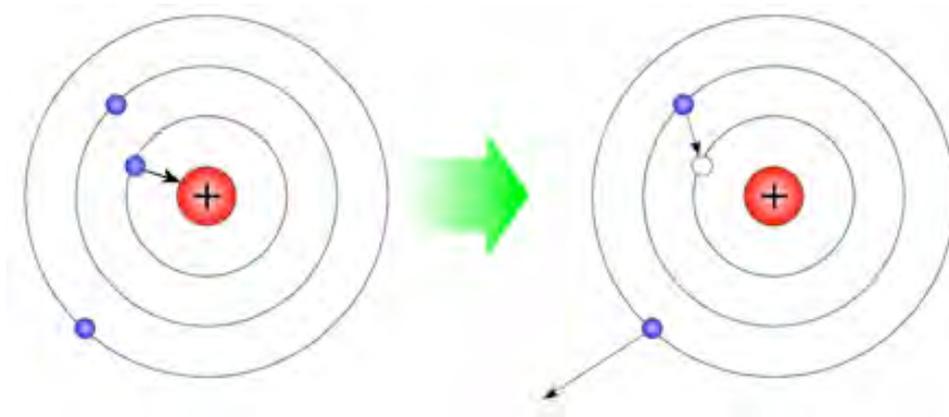
Un moyen d'améliorer la RIT consiste à utiliser des fragments d'anticorps ou autres vecteurs de taille inférieure à celle des anticorps qui présentent des propriétés de diffusion et de biodistribution dans l'organisme plus rapides. Il est également possible de pré-cibler la tumeur avec une première molécule non radiomarquée portant une spécificité pour la tumeur et une seconde spécificité pour un vecteur radiomarqué (Sharkey & Goldenberg 2011; Le Doussal et al. 1989). Ainsi, il suffit d'attendre que la fixation à la tumeur de la 1<sup>ère</sup> molécule non radiomarquée soit optimale avant d'injecter un vecteur radiomarqué se diffusant très rapidement dans l'organisme. Cela permet une accumulation des radioéléments à la tumeur plus rapide et donc une augmentation du débit de dose. Ces molécules sont également éliminées plus rapidement de l'organisme ce qui limite la toxicité médullaire. Cependant, l'élimination de ces petites molécules s'effectue le plus souvent par les reins qui deviennent alors les organes à toxicité limitante, surtout dans le cas de l'utilisation de radiométaux (tels que l'yttrium-90) qui ont tendance à s'accumuler dans les reins (Behr et al. 1997).

Malgré ces inconvénients, la RIT est généralement bien tolérée par rapport à la chimiothérapie et entraîne peu d'effet secondaires indésirables en dehors de la toxicité à la moelle ou aux reins.

### 3.2. Électrons Auger

Lorsqu'un radioélément subi une désintégration par capture électronique ou conversion interne, une vacance se crée au sein d'une couche électronique interne. Cette vacance est

rapidement comblée par un électron provenant d'une couche électronique de plus haute énergie ce qui s'accompagne d'une libération d'énergie. L'énergie peut être libérée sous forme de rayons X ou bien elle peut être transférée à un électron d'une couche externe qui sera alors éjecté. Cet électron émis est appelé électron Auger (Figure 14). Il s'en suit en général une cascade d'émission d'électrons Auger pour remplir la vacance électronique jusqu'à ce qu'elle atteigne une couche externe. Cinq à 30 électrons Auger sont émis par désintégration radioactive. Ces électrons ont une énergie très faible de quelques eV à 1 keV et leur portée varie de quelques fractions de nanomètre jusqu'à 0,5  $\mu\text{m}$  (Table 2). Du fait de leur TEL relativement élevé (4 à 26 keV/ $\mu\text{m}$ ) et de leur émission en cascade, les électrons Auger entraînent de nombreuses ionisations dans un périmètre très restreint autour de l'atome radioactif. Leur portée réduite nécessite donc un ciblage très proche des cibles radiosensibles (i.e. ADN) pour obtenir une efficacité biologique.



**Figure 14 : Émission d'un électron Auger à la suite d'une capture électronique**

La désintégration par capture électronique (à gauche) entraîne une vacance sur une couche électronique inférieure. Un électron d'une couche supérieure vient ensuite combler cette vacance (à droite) et transfère de l'énergie à un électron d'une couche externe qui se trouve éjecté.

L'efficacité du ciblage nucléaire des émetteurs Auger tels que l'iode-125 ou l'indium-111 a été démontrée dans des modèles précliniques utilisant des analogues de nucléotides (Bloomer & Adelstein 1977) ou des anticorps modifiés pour atteindre le noyau (Costantini et al. 2010). Dans ces conditions, 100 à 500 désintégrations suffisent pour tuer les cellules tumorales mais ce nombre augmente avec la distance au noyau et l'efficacité des Auger ne dépasse pas celles des rayons X lorsque l'énergie est déposée dans le cytoplasme ou à l'extérieur de la cellule (Kassis 2004).

Cependant, l'ADN n'est pas la seule cible radiosensible au sein des cellules et l'irradiation de la membrane plasmique peut également entraîner la mort cellulaire *via* la production de céramide (Haimovitz-Friedman et al. 1994; Kolesnick & Fuks 2003). Il a en effet été montré *in vitro* que le couplage d'un émetteur Auger à un anticorps non internalisé (irradiation à la membrane) était plus efficace que le couplage à un anticorps internalisé (irradiation dans le cytoplasme) sur deux modèles de carcinomes (Pouget et al. 2008). L'efficacité de la RIT Auger avec un anticorps non internalisé sur des tumeurs solides de petit volume a ensuite été confirmée dans un modèle préclinique de xénogreffe sur souris nude (Santoro et al. 2009).

La trajectoire très limitée des électrons Auger présente l'avantage de réduire l'irradiation de la moelle osseuse, ainsi l'activité injectable de radionucléides peut être augmentée jusqu'à dix fois par rapport à des émetteurs de particules  $\beta$  (Behr et al. 1998). Ces émetteurs pourraient donc constituer une alternative intéressante aux  $\beta$  pour le traitement de petites tumeurs solides, de cancers hématologiques (Ochakovskaya et al. 2001) ou servir de traitement de consolidation pour l'élimination de maladies résiduelles (micrométastases).

Radionuclide (#)*	Half-Life	Total Electron Yield Per Decay		
		"Long"-Range Electrons (%)	"Short"-Range Electrons (%)	"Very Short"-Range Electrons (%)
<sup>125</sup> I (20)	60.5 days	20 (98)	18 (86)	8 (39)
<sup>123</sup> I (11)	13.3 hours	11 (98)	10 (89)	5 (40)
<sup>77</sup> Br (7)	57 hours	7 (100)	6 (95)	3 (51)
<sup>111</sup> In (15)	3 days	15 (98)	14 (91)	8 (53)
<sup>195m</sup> Pt (36)	4 days	33 (92)	33 (79)	7 (19)
	Range:	<0.5 $\mu\text{m}$	<100 nm	<2 nm
	LET†:	4 to 26 keV/ $\mu\text{m}$	9 to 26 keV/ $\mu\text{m}$	<18 keV/ $\mu\text{m}$

\*Average number of electrons emitted/decay.

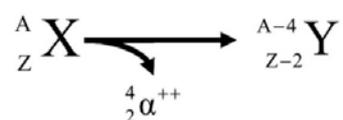
†Fit of data by Cole.<sup>4</sup>

**Table 2 : Caractéristiques des électrons Auger émis par différent radioéléments**

Table issue de (Kassis 2008). Copyright © Elsevier.

### 3.3. Émetteurs $\alpha$

L'émission  $\alpha$  se produit pour des isotopes dont le noyau comporte trop de nucléons pour être stable, un noyau d'hélium composé de 2 protons et 2 neutrons ( ${}^4\text{He}^{2+}$ ) est alors émis.



L'énergie des particules  $\alpha$  émises par désintégration radioactive est comprise entre 5 et 9 MeV pour un trajet dans les tissus de l'ordre de 50 à 90  $\mu\text{m}$ , leur TEL est donc très élevé

( $\sim 100 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ). Les  $\alpha$  étant des particules chargées (comme les protons et les ions carbone), le dépôt de l'énergie le long de leur parcours présente un pic de Bragg et le TEL se trouve augmenté en fin de trajet (Figure 15).

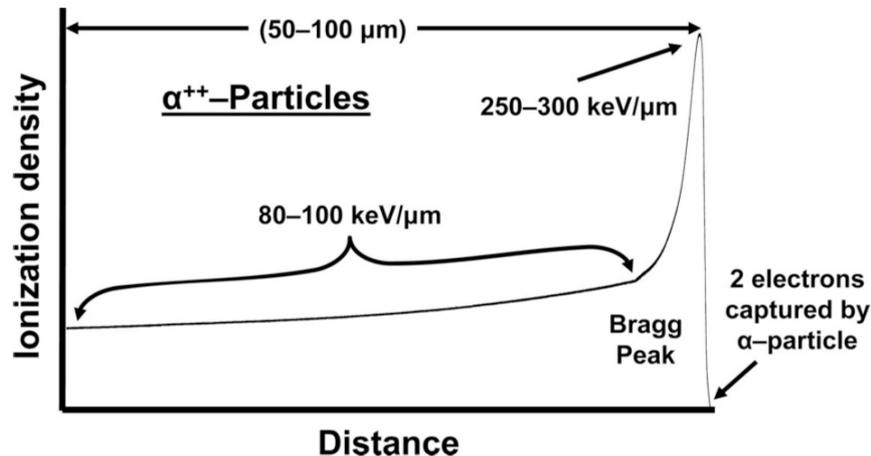


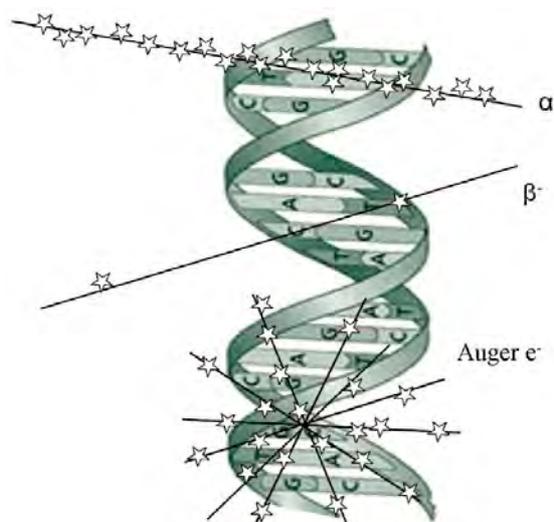
Figure 15 : Évolution du TEL en fonction de la distance parcourue pour une particule  $\alpha$

Graphique issu de (Kassis 2008). Copyright © Elsevier.

### 3.3.1. Radiobiologie des $\alpha$

Les particules  $\alpha$ , à l'instar des autres particules à haut TEL, induisent des dommages complexes à l'ADN. En effet, du fait de la forte densité d'ionisation de ces particules, elles causent de multiples lésions très proches les unes des autres sur l'ADN (Figure 16) et sont moins facilement réparables que les lésions espacées causées par une irradiation de faible TEL. L'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 induit par les dommages à l'ADN est également plus marqué après une irradiation  $\alpha$  qu'avec des rayons  $\gamma$  (Lücke-Huhle 1982). Ces données ont récemment été confirmées *in vivo* dans un modèle préclinique de cancer disséminé du péritoine traité par RIT  $\alpha$  (Yong et al. 2012).

Des études ont montré que l'irradiation du noyau par quelques particules seulement suffit à causer la mort cellulaire (Søyland & Hassfjell 2000). Dans le cas d'une RIT avec ciblage membranaire, quelques dizaines d'émetteurs  $\alpha$  suffisent à induire la mort cellulaire là où plusieurs milliers d'émetteurs  $\beta$  sont nécessaires (Humm & Cobb 1990). Les particules  $\alpha$  sont donc très cytotoxiques et leur EBR par rapport aux rayons X est généralement considérée comprise entre 3 et 5 (Sgouros et al. 2010). De plus, leur effet cytotoxique est peu sensible à l'oxygénation des cellules, au débit de dose de l'irradiation et à la distribution des cellules cibles dans le cycle cellulaire.



**Figure 16 : Répartition spatiale des ionisations au sein d'une molécule d'ADN pour une particule  $\alpha$ , une particule  $\beta$  et un émetteur d'électrons Auger**

Les particules  $\beta$  possédant un TEL très faible, les ionisations sont très espacées sur leur parcours. À l'inverse, les particules  $\alpha$  et les électrons Auger entraînent un grand nombre d'ionisations sur une très courte distance. De plus, les électrons Augers étant émis en cascade, la désintégration d'un émetteur Auger, entraîne une très forte densité d'ionisations dans un rayon restreint. Illustration issue de (Sadeghi et al. 2010). Copyright © Medknow publications and media Ltd.

Cependant, les mécanismes conduisant à la mort cellulaire après l'irradiation par des émetteurs  $\alpha$  sont encore mal connus et relativement peu étudiés. Macklis *et al.* ont observé par microscopie électronique, après irradiation de cellules de lymphome murin avec du bismuth-212, des bourgeonnements membranaires accompagnés de condensation de la chromatine caractéristiques de l'apoptose (Macklis et al. 1992; Palayoor et al. 1993). En accord avec ces résultats, Friesen *et al.* ont observé, chez des cellules leucémiques irradiées par du bismuth-213, une augmentation du nombre de cellules hypodiploïdes (sub G1) indiquant également une mort par d'apoptose (Friesen et al. 2007; Friesen et al. 2013). L'équipe de Richard Kolesnick a elle démontré que l'induction d'apoptose était due, du moins en partie, à l'effet de l'irradiation sur la membrane plasmique (Seidman et al. 2011). En revanche, Seidl *et al.* ont eux observé une augmentation de l'expression des gènes qui inhibent l'apoptose et entraînent la nécrose ou la catastrophe mitotique sur des cellules de cancer gastrique irradiées par du bismuth-213 (Seidl et al. 2007). De plus, la mort cellulaire induite par le bismuth était indépendante de la caspase 3 et ne pouvait être inhibée par l'inhibiteur pan-caspase Z-VAD-FMK (Seidl et al. 2005). Une autre étude de notre groupe a montré que la réponse à

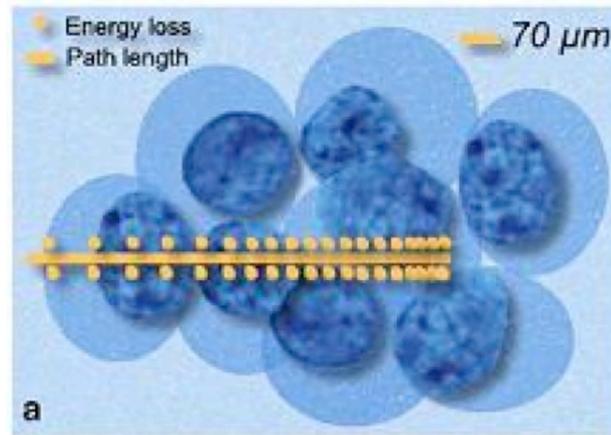
l'irradiation  $\alpha$  peut varier d'une lignée cellulaire à l'autre. En effet, l'irradiation par du bismuth-213 de différentes lignées de myélome multiple n'a induit l'expression de l'antigène apo 2.7, caractéristique de l'apoptose, que sur 2 des 3 lignées étudiées alors que la diminution de survie clonale était similaire pour les 3 lignées (Supiot 2005). Tous ces travaux sont très disparates en terme de protocole d'irradiation (irradiation externe, radioéléments différents, isotopes conjugués à des anticorps internalisant ou non internalisant), en terme de méthode d'identification de la mort cellulaire (Annexine V, apo 2.7, cellules sub G1, caractères morphologiques) et en terme de modèles cellulaires utilisés (tumeurs hématologiques, tumeurs solides). Des études supplémentaires et plus détaillées seront donc requises pour mieux comprendre les mécanismes de mort cellulaire liés à l'irradiation  $\alpha$ , leur dépendance vis à vis de la dose, du débit de dose, des cibles de l'irradiation (ADN, membrane ou autre) ainsi que la variabilité des réponses en fonction du type tumoral étudié.

### 3.3.2. Études précliniques

Les études s'intéressant aux mécanismes de la RIT  $\alpha$  *in vivo* sont encore plus rares. Ces études sont pourtant primordiales car bien plus pertinentes que les études *in vitro*, elles permettent en effet d'étudier la réponse des cellules tumorales à l'irradiation dans le contexte du microenvironnement tumoral. À ce jour, seuls Yong *et al.* se sont intéressés aux effets *in vivo* de la RIT  $\alpha$  utilisant le plomb-212/bismuth-212 dans le traitement d'une xéno greffe de cancer (LS-174T) disséminée dans le péritoine de souris athymiques. Ils ont montré que cet émetteur  $\alpha$  entraîne sur les cellules tumorales ciblées une augmentation des lésions double brin de l'ADN, une altération des mécanismes de réparation de l'ADN par recombinaison homologue (diminution de Rad 51), un arrêt en G2/M et une induction d'apoptose jusqu'à un maximum de 10% des cellules tumorales (Yong et al. 2012).

Malgré le peu d'informations disponibles sur les mécanismes cellulaires conduisant à la mort des cellules irradiées, l'efficacité des particules  $\alpha$  pour l'élimination des cellules tumorales est indéniable. Elle a été démontrée par de nombreuses études *in vitro* et de plus en plus d'études précliniques montrent également une efficacité *in vivo* (Elgqvist et al. 2005; Orozco et al. 2013; Mulford et al. 2005). En comparaison avec les particules  $\beta$ , les  $\alpha$  ont un trajet plus court dans les tissus, correspondant à la traversée de quelques cellules seulement, et produisent une densité d'ionisations beaucoup plus grande (Figure 17). Ces caractéristiques permettent aux émetteurs  $\alpha$  d'apporter une énergie d'irradiation plus grande aux cellules ciblées tout en diminuant l'irradiation des cellules environnantes. *In vivo*, la RIT  $\alpha$  devrait donc bénéficier d'un ratio dose absorbée par la tumeur versus dose absorbée par le reste du corps favorable et

ainsi permettre une meilleure élimination des cellules tumorales tout en diminuant la toxicité par rapport à la RIT  $\beta$ . Les quelques études comparant l'utilisation de la RIT  $\alpha$  par rapport à la RIT  $\beta$  semblent effectivement confirmer cet avantage théorique (Bloomer et al. 1984; Behr et al. 1999; Andersson et al. 2001).



**Figure 17 : Parcours d'une particule  $\alpha$  dans les tissus**

Représentation schématique du trajet d'une particule  $\alpha$  au travers de cellules tumorales. Les étoiles représentent les dépôts d'énergie entraînant l'ionisation de la matière. Illustration issue de (Couturier et al. 2005). Copyright © Springer.

Toutefois, le parcours restreint des particules  $\alpha$  limite aussi la possibilité de feux croisés, l'utilisation d'émetteurs de particules  $\alpha$  est donc moins efficace pour traiter les tumeurs solides volumineuses. Elgqvist *et al.* ont effectivement montré que l'efficacité de la RIT diminue lorsque la taille de la tumeur à traiter augmente (Elgqvist et al. 2006).

La RIT  $\alpha$  semble donc mieux indiquée pour le traitement de maladies disséminées, telles que des cancers hématologiques ou métastatiques, ou pour le traitement de maladie résiduelle en consolidation après d'autre traitement. De plus, plusieurs études montrent que les particules  $\alpha$  sont capables d'éliminer des cellules résistantes à la chimiothérapie ou à la radiothérapie (Friesen et al. 2007; Friesen et al. 2013; Haro et al. 2012). Il pourra donc être intéressant d'utiliser la RIT  $\alpha$  après d'autres modalités de traitement qui auront permis de réduire le volume tumoral mais n'auront pas atteint une rémission complète en raison de la présence de cellules radio- ou chimiorésistantes.

### 3.3.3. Essais cliniques

En toute logique, le premier essai clinique de RIT  $\alpha$  a donc été réalisé dans le traitement de leucémies myéloïdes (Jurcic et al. 2002). Un anticorps anti-CD33 couplé au bismuth-213 a

été utilisé, ce radioimmunoconjugué a permis un ciblage rapide en 5 à 10 minutes des zones leucémiques (moelle osseuse, foie et rate) et aucun autre organe n'a été irradié. Le rapport entre la dose absorbée par les sites tumoraux et le reste du corps était plus de 1000 fois supérieur à ceux observés avec des émetteurs  $\beta$  dans les mêmes conditions. Sur 18 patients traités, 14 ont obtenu une réponse partielle et aucune toxicité extramédullaire ne fut observée. Cet essai a fourni la preuve de concept pour l'utilisation de la RIT  $\alpha$  dans le traitement de cancers disséminés.

D'autres essais ont donc suivi, utilisant différents émetteurs  $\alpha$  (astate-211, actinium-225, plomb-212, Table 3) et différents vecteurs en fonction du type de cancer (Table 4). Tous ces essais ont montré la faisabilité de la RIT dans les cancers disséminés et une faible toxicité. L'utilisation la plus testée d'un émetteur  $\alpha$  concerne l'Alpharadin (chlorure de radium-223). Il ne s'agit pas d'une RIT à proprement parler car elle ne met pas en jeu de vecteur pour le ciblage tumoral. Ce traitement exploite l'affinité naturelle du radium pour les tissus osseux afin de traiter les métastases osseuses associées aux cancers de la prostate. Ce traitement a fait l'objet d'un effet de phase I, 3 essais de phase II et entre désormais en phase III.

Malgré ces premiers résultats très encourageants, il n'y a encore que très peu d'essais évaluant l'utilisation des émetteurs de particules  $\alpha$  en clinique. Ceci est en grande partie dû à la faible disponibilité des sources d'émetteurs  $\alpha$  (Brechbiel 2007), mais aussi à la relative difficulté de mise en œuvre de ces traitements par rapport aux  $\beta$ .

Radionuclide	Z	Half-life	Mean particle energy* (MeV)	Maximum energy (MeV)	Average range ( $\mu\text{m}$ )	<LET> (keV/ $\mu\text{m}$ )
<sup>211</sup> At	85	7.2 h	6.79	7.45	60	71
<sup>213</sup> Bi	83	45.6 min	8.32	8.38	84	61
<sup>223</sup> Ra	88	11.43 d	5.64	7.59	45	81
<sup>225</sup> Ac	89	10.0 d	6.83	8.38	61	71

\*weighted average of emissions.

**Table 3 : Caractéristiques physiques de différent émetteurs de particules  $\alpha$**

Table issue de (Huang et al. 2012). Copyright © 2012 Chen-Yu Huang et al.

Essai clinique / Référence	Type de Cancer	Radioimmunoconjugué	Résultat
Groupe Sheinberg <a href="http://clinicaltrials.gov">http://clinicaltrials.gov</a> NCT00672165	AML	<sup>225</sup> Ac-HuM195 ( <sup>225</sup> Ac-lintuzumab ; anti-CD33)	18 patients traités ; essai étendu à une étude multicentrique de phase I/II
(Jurcic et al. 2002)	AML	<sup>213</sup> Bi-HuM195	Réduction des blast dans la moelle osseuse de 14 patients sur 18 traités
(Rosenblat et al. 2010)	AML	<sup>213</sup> Bi-HuM195	31 patients traités ; réduction des blast à toutes les doses
Équipe Heeger ACS meeting abstract	Lymphome B non Hodgkinien	<sup>213</sup> Bi-anti CD19 <sup>213</sup> Bi-anti CD20	9 patients traités ; réponse chez 2 patients ; toxicité limitée chez 2 patients
Group Allen (Raja et al. 2007)	Mélanome	<sup>213</sup> Bi-mAb 9.2.27 (anti-MSCP)	22 patients traités ; 6% réponse complète ; 14% réponse partielle ; 50% maladie stable ; pas de toxicité
Groupe Merlo (Kneifel 2006) (Cordier et al. 2010)	Glioblastome	<sup>213</sup> Bi-substance P	5 patients traités ; amélioration de l'indice de Barthel pour 2 patients
Équipe Zalutsky (Zalutsky et al. 2007)	Glioblastome	<sup>211</sup> At-ch81C6 (anti-tenascin)	18 patients traités ; 14 ont survécu 12 mois ; pas de toxicité sévère
Équipe Andersson (Andersson et al. 2009)	Cancer des ovaires	<sup>211</sup> At-MX35-F(ab') <sub>2</sub>	9 patients traités ; aucune toxicité significative
Areva Med LLC NCT01384253	Cancer des ovaires	<sup>212</sup> Pb-TCMC-trastuzumab (anti-Her2/neu)	3 patients traités ; étude en cours
Équipe Parker NCT00699751	Cancer de la prostate avec métastases osseuses	Alpharadin ( <sup>223</sup> Ra chloride)	292 patients traités ; médiane de survie augmentée de 4,5 mois par rapport au groupe placebo

**Table 4 : Liste des essais cliniques utilisant des émetteurs de particule  $\alpha$ .**

Tableau traduit de (Baidoo et al. 2013). Copyright © AACR

## 4. Implication du système immunitaire dans la réponse à l'irradiation

### 4.1. Effet abscopal

Les rayonnements ionisants, en plus de leur action cytotoxique directe sur les cellules irradiées, peuvent engendrer une réponse anti-tumorale sur des cellules qui n'ont pas reçu l'irradiation. Il existe en effet de rares cas cliniques pour lesquels on a observé une régression de tumeurs situées en dehors du champ d'irradiation (Takaya et al. 2007; Lakshmanagowda et al. 2009; Okuma et al. 2011). Ce phénomène rare fut pour la première fois décrit en 1953 par le Dr. R.H. Mole qui le qualifia d'effet abscopal (du latin ab- scopus : au loin de la cible). De façon plus large, l'effet abscopal désigne tout effet systémique observé après un traitement local.

Cependant, l'irradiation de la tumeur primaire peut aussi entraîner des effets néfastes sur les métastases distantes. Camphausen *et al.* ont montré, dans un modèle de cancer pulmonaire métastatique, que l'élimination de tumeurs primaires sécrétant de l'angiostatine par l'irradiation entraînait une accélération de la pousse métastatique. Cet effet n'était pas du à un effet spécifique de l'irradiation, mais à l'élimination de la source d'angiostatine, un inhibiteur de l'angiogénèse, qui permettait de garder les métastases dans un état de dormance (Camphausen et al. 2001). Dans un modèle de cancer métastatique du sein, l'irradiation (ou la chimiothérapie), entraînait une augmentation du taux de TGF- $\beta$  circulant ce qui favorisait également le développement des métastases dans les poumons (Biswas et al. 2007). À l'inverse, d'autres études montrent un effet bénéfique d'une radiothérapie locale sur les tumeurs distantes. Camphausen *et al.* ont en effet observé sur des souris, que l'irradiation d'une patte non porteuse de tumeur était capable de ralentir considérablement la croissance d'une tumeur implantée dans le dos. Cet effet semblait dépendant de p53 puisque absent chez des souris KO pour p53 (Camphausen et al. 2003).

L'effet abscopal est un phénomène très rare en clinique, toutefois, un nombre croissant d'études précliniques indique qu'il est possible de favoriser sa survenue en modulant le système immunitaire. En effet, de multiples études décrivent un effet abscopal après un traitement combiné de radiothérapie locale et immunothérapie. Charavarty *et al.* ont montré, dans un modèle de cancer pulmonaire métastatique, que la radiothérapie combinée à l'injection d'une molécule induisant l'expansion des DC (Flt3-L) permettait une réduction des métastases et une augmentation de survie de 56% des animaux. La radiothérapie seule ne permettait que le contrôle de la tumeur primaire mais les animaux succombaient rapidement

des métastases pulmonaires. Le traitement par Flt3-L seul prolongeait la survie mais les souris finissaient également par succomber. L'effet abscopal n'était en revanche pas observé chez des souris *nude* ne possédant pas de lymphocytes T (Chakravarty et al. 1999). Dans une étude similaire, Demaria *et al.* ont montré que l'irradiation d'une tumeur située sur le flanc droit combinée à l'injection systémique de Flt3-L permettait la régression d'une seconde tumeur située sur le flanc gauche. L'un ou l'autre des traitements seul n'avait aucun effet sur la tumeur secondaire. De plus, le traitement combiné n'avait pas d'effet si la tumeur secondaire était différente de la tumeur irradiée ou si la souris était déficiente en lymphocytes T (Demaria et al. 2004). Dans ces 2 études, l'effet abscopal engendré implique donc une réponse anti-tumorale spécifique nécessitant les lymphocytes T. Une autre étude combinant la radiothérapie à l'injection d'une cytokine proinflammatoire a montré l'implication des lymphocytes T (CD4 et CD8) ou des cellules natural killer (NK) en fonction du type tumoral considéré (Shiraishi et al. 2008).

Quelques essais cliniques commencent également à tester la synergie entre radiothérapie locale et immunothérapie. Gulley *et al.* ont testé la combinaison entre radiothérapie externe et vaccination contre l'antigène prostatique spécifique (PSA) chez des patients atteints de cancer de la prostate localisé dans un essai clinique randomisé de phase II. La majorité des patients a développé une réponse lymphocytaire T dirigée spécifiquement contre cet antigène tumoral, de plus, certains ont aussi développé une réponse contre d'autres antigènes tumoraux non présents dans le vaccin (Gulley et al. 2005). Cette diversification de la réponse a également été observée dans un modèle préclinique couplant vaccination et radiothérapie et permet l'élimination de métastases n'exprimant pas la même combinaison d'antigènes tumoraux que la tumeur primaire (Hodge et al. 2012). Une étude en cours du groupe du Dr. Formenti étudie l'association de la radiothérapie locale avec l'injection de GM-CSF, un effet abscopal a été observé pour 30% des 14 patients ayant intégré l'essai (Formenti & Demaria 2009). Dans un essai de phase I/II testant l'injection intratumorale d'un agoniste du TLR9 en combinaison avec la radiothérapie pour le traitement de lymphomes B, 27% des patients ont développé une réponse anti-tumorale en dehors du champ d'irradiation (Brody et al. 2010). Le groupe du Dr. Gabrilovich a testé l'association de la radiothérapie avec l'injection intratumorale de cellules dendritiques (DC) chez des patients atteints de sarcomes des tissus mous. Le traitement a permis une forte accumulation de lymphocytes T dans la tumeur et plus de 50% des patients ont développé une réponse anti-tumorale spécifique (Finkelstein et al. 2012). Récemment, 3 cas d'effet abscopal ont également été rapportés suite à un traitement par irradiation associé à

l'utilisation d'un anticorps anti-CTLA-4 (Ipilimumab) chez des patients atteints de mélanome (Postow et al. 2012; Hiniker et al. 2012). Ces observations reflètent les résultats précliniques observés par l'équipe du Dr. Demaria (Demaria et al. 2005; Dewan et al. 2009).

Tous ces travaux démontrent l'importance des interactions entre rayonnements ionisants et système immunitaire pour la mise en place d'une réponse anti-tumorale efficace. Il est donc primordial dès lors que l'on s'intéresse aux radiations ionisantes de prendre en considération leurs effets sur la réponse immune. Ces effets peuvent résulter de l'action des radiations sur les cellules tumorales mais également sur leur microenvironnement ou sur les cellules de l'immunité.

#### **4.2. Effets des rayonnements ionisants sur le système immunitaire**

L'irradiation est traditionnellement considérée comme immunosuppressive du fait de l'aplasie médullaire causée par une radiothérapie du corps entier. Les cellules souches hématopoïétiques, dont dérivent les cellules du système immunitaire, sont en effet très radiosensibles. De plus, les rayonnements ionisants peuvent entraîner la production de TGF- $\beta$ , une cytokine dont l'effet est immunomodulateur (Barcellos-Hoff et al. 1994; Wan & Flavell 2007). Les lymphocytes T régulateur (Treg) sont également moins radiosensibles que les lymphocytes T effecteurs, l'irradiation peut donc favoriser l'immunosuppression en augmentant la proportion de Treg par rapport aux T effecteurs (Kachikwu et al. 2011). Enfin, l'irradiation peut entraîner une inflammation chronique, dépendante de la production de radicaux libres, favorable au développement tumoral (Wright & Coates 2006) et polariser le phénotype des macrophages infiltrant les tumeurs en faveur d'un phénotype M2 immunosuppresseur et tumorigène (Tsai et al. 2007).

Cependant, dans le cas d'une irradiation localisée et lorsque les organes lymphoïdes sont épargnés, les rayonnements ionisants peuvent participer au développement de la réponse immunitaire. Il a notamment été démontré que l'irradiation provoque la sécrétion de multiples cytokines pro-inflammatoires qui stimulent l'action des effecteurs de l'immunité et participent à l'élimination des cellules tumorales. Par exemple, Lugade *et al.* ont montré que l'irradiation entraîne la production d'IFN- $\gamma$  et que cette molécule induit le recrutement de lymphocytes T cytotoxique et facilite la reconnaissance des cellules tumorales par ces lymphocytes (Lugade et al. 2008). Plus récemment, Burnette *et al.* ont démontré que l'irradiation conduit au recrutement de DC et la production d'interférons de type I au sein de la tumeur. La production d'interféron était nécessaire à l'activation des DC pour la mise en

place d'une réponse lymphocytaire T anti-tumorale (Burnette et al. 2011). Il aussi été montré que l'irradiation entraîne la production par les cellules tumorales de chimiokines telles que CXCL16 qui induisent le recrutement de lymphocytes T cytotoxiques (Matsumura et al. 2008) et de cytokines telles que le TNF- $\alpha$  qui participe à l'effet cytotoxique de l'irradiation sur les tumeurs (Hallahan et al. 1989). La radiothérapie peut donc être un moyen efficace d'induire une inflammation aiguë facilitant la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale.

#### **4.3. Effets des rayonnement ionisants sur l'immunogénicité des cellules tumorales**

De surcroît, l'irradiation des cellules tumorales à des doses non cytotoxiques favorise leur reconnaissance par le système immunitaire. Ces effets ont été investigués en détail par le groupe du Dr. Chakraborty dans une série de travaux très complets. Une 1<sup>ère</sup> étude sur un modèle d'adénocarcinome murin, a démontré que l'irradiation entraîne une augmentation de l'expression de Fas, un récepteur dont l'engagement peut déclencher la mort cellulaire. Cette surexpression survient aussi bien *in vitro* que *in vivo* et sensibilise les cellules tumorales à l'action des lymphocytes T cytotoxiques qui expriment le ligand de Fas (Fas-L). *In vivo*, l'association de la radiothérapie et du transfert adoptif de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de la tumeur a permis l'élimination complète de 50% des tumeurs et un ralentissement marqué de la pousse tumorale pour les 50% restant. L'un ou l'autre de ces 2 traitements seuls n'a pas permis de réduire significativement la pousse tumorale, l'irradiation permet donc bien de sensibiliser les cellules tumorales à l'action des lymphocytes T (Chakraborty et al. 2003). L'irradiation entraîne aussi une augmentation de l'expression des CMH de classe I à la surface de ces cellules ainsi que la production de nouveaux peptides et permet donc la présentation de complexes CMH-peptide spécifiques aux cellules irradiées (Reits et al. 2006). Une autre étude portant sur 23 lignées tumorales humaines a montré une augmentation de l'expression de Fas et des CMH de classe I après irradiation mais aussi de ICAM-1 (une molécule d'adhésion), l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) et mucine-1 (2 antigènes associées au tumeurs). Toutes les tumeurs étudiées ne surexpriment pas toutes ces molécules mais 91% en surexpriment au moins 1 après l'irradiation. L'expression de nombreux gènes, dont certains gènes impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN et dans la régulation du cycle cellulaire, est également modifiée après irradiation (84 gènes surexprimés et 6 gènes sous-exprimés). La sensibilité des tumeurs surexprimant l'ACE dans un contexte HLA-A2 a été testé par un test de cytotoxicité au chrome-51. Pour les 5 tumeurs concernées, la lyse par les lymphocytes T spécifiques était significativement augmentée après

irradiation (Garnett et al. 2004). Tous ces travaux ont été réalisés après une irradiation par des rayons  $\gamma$  (source de césium-137). Pour tester l'effet d'une irradiation par un émetteur de particules  $\beta$ , le samarium-153, utilisé en clinique pour le traitement palliatif des métastases osseuses, a été testé sur 10 lignées cancéreuses humaines (4 cancers de la prostate, 2 cancers du sein et 4 cancers du poumon). Toutes les tumeurs investiguées ont vu leur expression de Fas augmenter en réponse au samarium-153 et la majorité a subi une augmentation de l'ACE (90%), de mucine-1 (60%), des CMH de classe I (50%) et de ICAM-1 (40%). Un test de cytotoxicité a également été réalisé sur une des lignées de cancer de la prostate (LNCaP). Cette lignée était plus sensible à la lyse par des lymphocytes T cytotoxiques spécifique de PSA, ACE ou mucine-1 après traitement au samarium (Chakraborty, Wansley, et al. 2008b). L'ensemble de ces travaux démontre clairement que l'irradiation entraîne une sensibilité accrue des cellules tumorales à la lyse par les lymphocytes T cytotoxiques. Il a aussi été montré que les radiations ionisantes peuvent induire l'augmentation d'expression de multiples ligands de NKG2D, un récepteur activateurs des cellules NK, à la surface des cellules tumorales. L'expression de ces ligands favorise la lyse des cellules tumorales par les cellules NK (J.-Y. Kim et al. 2006). L'irradiation, en plus de ses effets cytotoxiques directs peut donc agir en synergie avec le système immunitaire.

#### **4.4. Mort cellulaire immunogène**

La destruction des cellules tumorales par les rayonnements ionisants permet de fournir des antigènes tumoraux aux cellules présentatrices d'antigènes telles que les DC pour le priming et l'activation des lymphocytes T. Seulement, toute mort cellulaire n'entraîne pas une réponse immunitaire. L'organisme est en effet capable de faire la distinction entre mort immunogène et mort non-immunogène et les mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant à une mort immunogène ont en partie été élucidés (Kroemer et al. 2013). En particulier, 3 molécules semblent nécessaires à l'induction de la mort immunogène : la calréticuline, l'ATP et HMGB1.

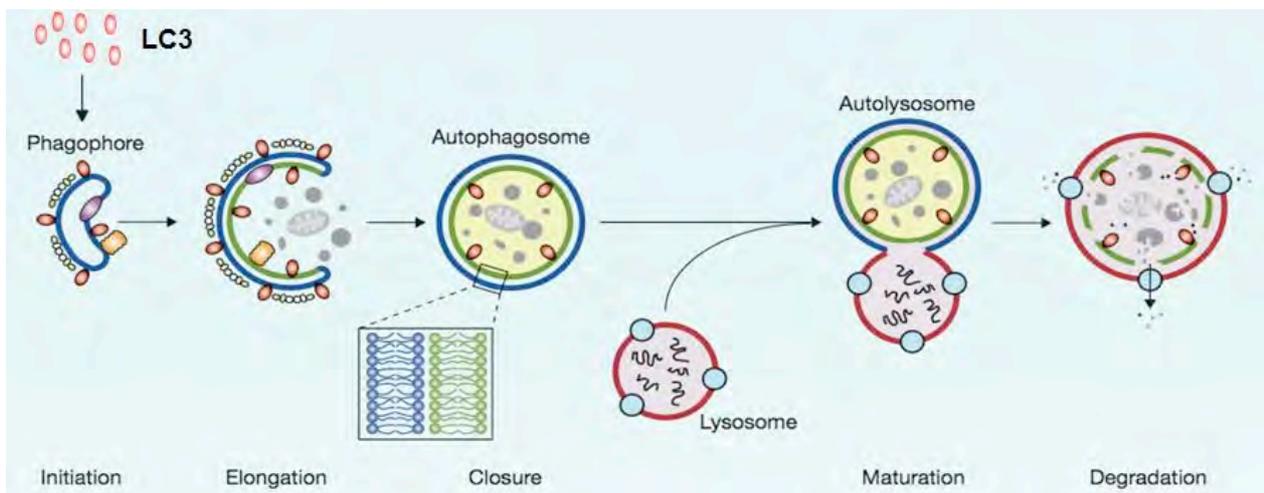
##### **4.4.1. Expression membranaire de Calréticuline**

La calréticuline est une protéine chaperonne du réticulum endoplasmique. Les inducteurs de mort cellulaire immunogène induisent un stress du réticulum endoplasmique qui entraîne la translocation d'une partie de la calréticuline à la membrane plasmique où elle se trouve exposée à la surface de la cellule (Obeid et al. 2006). La calréticuline est ensuite reconnue par le récepteur CD91, présent sur les macrophages et les DC, ce qui conduit à la phagocytose de la cellule mourante (Gardai et al. 2005). Les cellules tumorales phagocytées peuvent ensuite

être digérées et les antigènes tumoraux peuvent être représentés par les DC pour le priming et l'activation des lymphocytes T. Il a été montré que l'irradiation  $\gamma$  et UV-C peuvent induire l'exposition membranaire de la calréticuline (Obeid et al. 2007) mais aucune information n'est disponible pour d'autres types de rayonnements ionisants.

#### 4.4.2. Autophagie et sécrétion d'ATP

L'autophagie (faisant ici référence à la macroautophagie) est un mécanisme cellulaire complexe qui permet la ségrégation de matériel cytoplasmique (agrégats de protéines, organelles) dans des vésicules à double membrane appelées autophagosomes. L'initiation de l'autophagie requiert la conversion de la protéine LC3 I en sa forme clivée et conjuguée LC3 II qui est recrutée lors de la formation des autophagosomes. Ces vésicules à double membrane fusionnent ensuite avec les lysosomes pour dégrader et recycler le contenu de l'autophagosome pour le métabolisme cellulaire (Figure 18). L'autophagie est un mécanisme de réponse à un stress cellulaire qui permet de détruire des organelles ou des protéines endommagées et d'apporter de l'énergie à la cellule.



**Figure 18 : Mécanisme de l'autophagie**

L'initiation de l'autophagie requiert le recrutement de LC3B-II pour former la membrane de l'autophagosome autour du matériel cytoplasmique à dégrader. L'autophagosome fusionne avec un lysosome pour former un autophagolysosome. Les hydrolases du lysosome procèdent alors à la dégradation du contenu de la vacuole autophagique. Illustration adaptée de (Z. Yang & Klionsky 2010). Copyright © Nature publishing group.

L'induction de la mort cellulaire immunogène entraîne l'activation du processus autophagique qui permet la sécrétion d'ATP dans le milieu extracellulaire. L'ATP est un métabolite cellulaire très abondant permettant de fournir l'énergie nécessaire à de nombreuses réactions chimiques mais c'est également l'un des chimioattractants les plus puissants pour le

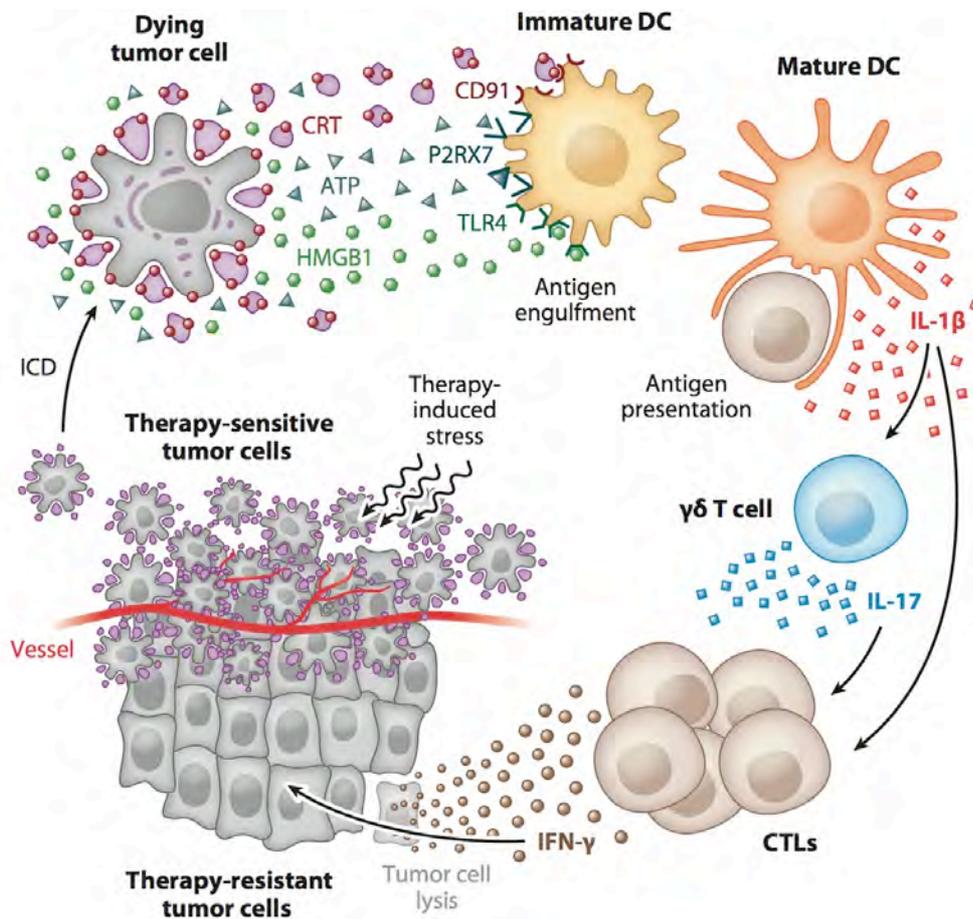
recrutement de cellules phagocytaires (Elliott et al. 2009). Les mécanismes reliant l'autophagie à la sécrétion d'ATP ne sont pas encore élucidés mais les cellules déficientes en autophagie ne sécrètent pas d'ATP en réponse aux inducteurs de mort immunogène et par conséquent ne permettent pas le recrutement de cellules immunes (Michaud et al. 2011). L'ATP permet également l'activation des cellules dendritiques par la voie du récepteur purinergique P2RX7 et induit chez ces cellules la production d'IL-1 $\beta$ , une cytokine proinflammatoire (Ghiringhelli et al. 2009). La radiothérapie conventionnelle (rayons X ou  $\gamma$ ) peut induire l'autophagie (Palumbo & Comincini 2012) mais une seule étude a montré l'induction d'autophagie par une irradiation de haut TEL avec des neutrons (Altmeyer et al. 2010) et aucune étude n'a investigué l'induction d'autophagie après la RIT.

#### **4.4.3. Relargage de HMGB1**

HMGB1 (High Mobility Group Box 1) est une protéine non-histone associée à la chromatine et présente de manière ubiquitaire dans le noyau des cellules. Lors de la mort cellulaire par nécrose primaire ou secondaire, l'intégrité des membranes cellulaires est perdue et HMGB1 est relarguée dans le milieu extracellulaire. HMGB1, comme l'ATP, est un « signal danger » pour l'organisme, c'est à dire une molécule libérée par les cellules stressées ou endommagées et qui permet l'activation du système immunitaire (Matzinger 2002; Scaffidi et al. 2002). HMGB1 se lie au TLR4 sur les DC et permet la crossprésentation des antigènes tumoraux aux lymphocytes T (Apetoh, Ghiringhelli, Tesniere, Criollo, et al. 2007a). L'irradiation de cellules tumorales par les rayons X permet la libération de HMGB1 et la consécutive crossprésentation des antigènes tumoraux par les DC (Apetoh, Ghiringhelli, Tesniere, Obeid, et al. 2007b), mais encore une fois l'effet d'autres types de radiations ionisantes n'a pas été étudié.

L'association de la calréticuline, l'ATP et HMGB1 en réponse à un inducteur de mort immunogène permet donc le recrutement des cellules de l'immunité, leur activation et la prise en charge efficace des cellules tumorales tuées pour la présentation des antigènes tumoraux aux lymphocytes T. Ces molécules induisent également la production d'IL-1 $\beta$  par les DC. La sécrétion d'IL-1 $\beta$  permet le recrutement de lymphocytes T  $\gamma\delta$  producteurs d'IL-17 et de T  $\alpha\beta$  producteur d'IFN- $\gamma$  qui participeront à l'élimination des cellules tumorales ayant résisté au traitement (Figure 19). L'induction de la mort immunogène est nécessaire à la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace, il est donc important d'investiguer la capacité de tout agent anticancéreux à induire ce type de mort. Dans le cas des rayonnements ionisants, il a été montré que les rayons X et  $\gamma$  sont des inducteurs de mort immunogène.

Cependant, il n'existe aucune information concernant les autres types de radiations. Il sera donc nécessaire, pour le développement des thérapies utilisant les émetteurs de particules  $\alpha$ ,  $\beta$  et d'électron Auger, de déterminer leur effet sur la mort cellulaire en regard de l'immunogénicité.



**Figure 19 : Mort cellulaire immunogène et induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale**

ICD : Immunogenic Cell Death ; CTL : Cytotoxic T Lymphocyte

Illustration issue de (Kroemer et al. 2013). Copyright © Annual reviews Inc.

## 5. Objectifs de la thèse

### 5.1. Radiobiologie des $\alpha$ dans le myélome multiple

Le myélome multiple (MM) est un cancer hématologique incurable résultant de la transformation d'un plasmocyte s'accumulant dans la moelle osseuse. C'est la 2<sup>nd</sup>e hémopathie après le lymphome non Hodgkinien, ce qui représente 13% des cancers hématologique et 1% de tous les cancers. Au cours de la dernière décennie, l'évolution des traitements a permis une amélioration significative de la médiane de survie des patients qui est passée de 3 à 4 ans avec les traitements conventionnels à 7 à 8 ans aujourd'hui (Raab et al. 2009). Cette avancée a été obtenue grâce à l'usage de thérapies agressives, de la greffe de cellules souches hématopoïétiques autologues, ainsi que le développement de nouvelles molécules comme des inhibiteurs du protéasome, tel que le bortézomib (Richardson et al. 2003), et des immunomodulateurs, comme le thalidomide (Singhal et al. 1999) et le lenalidomide (Rajkumar et al. 2005), utilisés en combinaison avec la dexaméthasone ou des agents alkylants. En dépit des avancées thérapeutiques, le MM demeure une pathologie de faible pronostic et le développement de nouveaux traitements innovants est donc requis pour augmenter l'espérance de vie des malades.

Le myélome multiple est un cancer disséminé dans la moelle osseuse et les plasmocytes surexpriment quelques marqueurs dont le CD38, le CD54 et le syndécan-1 (CD138). Contrairement au CD38 et CD54, le CD138 n'est pas exprimé sur les précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse, ce qui en fait un candidat idéal pour le ciblage par la RIT. Notre équipe a déjà validé l'utilisation du bismuth-213 couplé à un anticorps monoclonal anti-CD138 (B-B4) sur des lignées de myélome multiple dérivées de patients *in vitro* (Couturier et al. 1999). Nous avons également démontré la supériorité de l'utilisation de cet émetteur  $\alpha$  par rapport à l'utilisation d'un émetteur  $\beta$  *in vitro* (Supiot et al. 2002) et, récemment, nous avons montré l'efficacité du bismuth-213 couplé à un anticorps anti-CD138 dans un modèle préclinique de myélome murin (5T33), faisant ainsi la preuve de concept pour l'utilisation de la RIT  $\alpha$  dans le traitement du myélome multiple (Chérel et al. 2013).

Afin de mieux connaître les mécanismes permettant le bienfait thérapeutique des émetteurs de particules  $\alpha$  dans notre modèle, nous nous intéressons ici à la radiobiologie du bismuth-213 (<sup>213</sup>Bi), un émetteur de particules  $\alpha$  sur 2 modèles cellulaires de myélome multiple, l'un murin (5T33) et l'autre humain (LP-1) *in vitro*.

## 5.2. L'irradiation $\alpha$ entraîne-t-elle une mort immunogène ?

Dans la 2<sup>e</sup> partie de la thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'immunogénicité des cellules tumorales après irradiation par des particules  $\alpha$ . Nous avons vu que l'efficacité de la RIT semble être limitée pour le traitement de tumeurs solides et que l'induction d'une mort immunogène entraînait la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale permettant un bénéfice thérapeutique. Nous avons donc investigué les effets du bismuth-213 sur l'immunogénicité d'un adénocarcinome murin (MC-38). Plusieurs études ont déjà montré la possibilité d'associer la radiothérapie à l'immunothérapie pour optimiser le traitement de ce cancer colique (Chakraborty et al. 2004; Dewan et al. 2009) et une étude a testé la combinaison de la RIT  $\beta$  avec une vaccination anti-tumorale (Chakraborty, Gelbard, et al. 2008a). Cependant aucune étude n'a encore investigué l'effet de particules  $\alpha$  sur l'immunogénicité d'une tumeur.

## Matériels et méthodes

### 1. Lignées cellulaires, culture et traitements pharmacologiques

La lignée 5T33, établie par le Dr. J Radl du TNO Institute (Radl et al. 1988), fut obtenue auprès du Dr. H Turner (Department of Nuclear Medicine, Fremantle Hospital, Australie) et la lignée LP-1 fut obtenue auprès de la DSMZ (référence DSMZ : ACC 41). Les 2 lignées sont cultivées en milieu RPMI 1640 (Gibco) supplémenté de 10% de sérum de veau foetal (PAA), 2 mM de glutamine (Gibco), 100 U/mL de pénicilline (Gibco) et 100 µg/mL de streptomycine (Gibco). Les cellules sontensemencées au minimum 2 heures avant irradiation.

Pour l'inhibition de l'autophagie, les cellules sont traitées avec 1,25 mM de 3-méthyladénine (3-MA, Sigma). Pour le blocage de la dégradation des autophagosomes la Bafilomycine A1 (Sigma) est utilisée à 0,2 µM.

### 2. Irradiations au bismuth 213 (<sup>213</sup>Bi)

Le couplage de la BSA (Sigma) au CHX-A''-DTPA (Macrocyclics) est réalisé comme décrit ailleurs (Nikula et al. 1995) puis contrôlé par un marquage à l'indium-111. Le <sup>213</sup>Bi est élué à partir d'un générateur contenant de l'actinium-225 fixé à une résine d'AGMP-50 (Institut des TransUranien de Karlsruhe, Allemagne) par un mélange de 500 µL d'HCl 0,2 N et 500 µL de NaI 0,2 M. Pour le marquage, le <sup>213</sup>Bi est incubée avec 100 µg de BSA couplée au CHX-A''-DTPA dans 195 µL d'acétate de sodium 0,65 M (pH 5,3) et 75 µL d'acide ascorbique 20% pendant 10 min à 37°C. Le radioconjugué <sup>213</sup>Bi-BSA est ensuite purifié par chromatographie d'exclusion sur colonne PD-10 (GE Healthcare) pour éliminer le <sup>213</sup>Bi non conjugué. La solution contenant le bismuth est ensuite diluée dans du milieu de culture à l'activité volumique souhaitée avant d'être ajoutée aux cellules qui ont été ensemencées à une concentration finale de 4x10<sup>5</sup> cellules/mL au minimum 2h avant irradiation. La demi-vie du <sup>213</sup>Bi étant très courte (45,6 min), la décroissance de l'activité est prise en compte dans le temps nécessaire à la distribution du <sup>213</sup>Bi couplé à la BSA sur les cellules. Le calcul de la décroissance est réalisé selon l'équation :  $A(t) = A_0 * e^{-\ln 2 (dt/45,6)}$  : A étant l'activité au temps t, A<sub>0</sub> l'activité au temps t<sub>0</sub> et dt le temps écoulé entre t<sub>0</sub> et le temps t.

### 3. Irradiations aux UV

Les irradiations UV sont effectuées à l'aide d'une table UV équipée de tubes d'une puissance de 15W émettant des UV-B (longueur d'onde : 312nm).

#### **4. Mesure de la prolifération cellulaire par incorporation de thymidine tritiée (<sup>3</sup>H-thymidine)**

Les cellules sont ensemencées en plaque 96 puits à fond plat à raison de 100 µL/puits. 10 µL de <sup>3</sup>H-thymidine (Perkin Elmer) à 925 kBq/mL sont ajoutés dans les puits avant incubation à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> pendant 6h. Les cellules sont ensuite récoltées sur des filtres de fibre de verre (Perkin Elmer) à l'aide du récolteur (Tomtec). Afin de détecter la radioactivité incorporée, un liquide de scintillation (Betaplate Scint, Wallac) est ajouté et les filtres sont ensuite mesurés à l'aide d'un compteur bêta (1450 Microbeta Plus, Wallac).

#### **5. Analyse du cycle cellulaire**

À différents temps après irradiation, les cellules sont récoltées, centrifugées et remises en suspension dans 200 µL de PBS froid. Les cellules sont ensuite fixées et perméabilisées par l'ajout de 1 mL de méthanol et incubées au minimum 10 min à 4°C. Les cellules sont ensuite centrifugées et reprises dans 1 mL de solution de marquage de l'ADN contenant l'iodure de propidium (40 µg/mL; Sigma) et de l'ARNase (100 µg/mL; Sigma) pour 30 min à 37°C dans l'obscurité. Après un lavage en PBS, un minimum de 10.000 événements sont analysés au cytomètre de flux FACScalibur (BD Pharmingen) à l'aide du logiciel FlowJo (Tree Star, Inc).

#### **6. Western Blot**

##### **6.1. Lysats cellulaires pour les WB $\gamma$ H2AX :**

Les Lysats cellulaires sont réalisés à l'aide d'une solution de lyse RIPA comprenant : Tris 25 mM pH 7.6, NaCl 150 mM, NP-40 1%, sodium deoxycholate 1%, SDS 0,1%, complétement extemporanément avec des inhibiteurs de protéases : Pefablock (100µg/mL), Aprotinine (5 µg/mL) et Leupeptine (5 µg/mL), et un inhibiteur de phosphatases : Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (1 mM). Un mL de solution RIPA est utilisé pour 2,5 x10<sup>7</sup> cellules/mL. S'en suit une incubation sur glace pendant 30 min en agitant au vortex régulièrement puis centrifugation à 20.000 xg pendant 15 min à 4°C. Le surnageant contenant les protéines phosphorylées est alors récupéré et conservé à -80°C.

##### **6.2. Lysats cellulaires pour WB LC3**

Les Lysats cellulaires sont réalisés à l'aide d'une solution de lyse Triton X-100 1% : Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, TX-100 1%, complétement extemporanément avec des inhibiteurs de protéases : Pefablock (100 µg/mL), Aprotinine (5 µg/mL) et Leupeptine (5 µg/mL), à raison de 2,5x10<sup>7</sup> cellules/mL de tampon de lyse. S'en suit une incubation sur glace pendant

30 min en agitant au vortex régulièrement puis centrifugation à 20.000 xg pendant 15 min à 4°C. Le surnageant contenant les protéines phosphorylées est alors récupéré et conservé à -80°C.

### 6.3. Dosage protéique

Le dosage protéique est effectué sur 10 µL de lysat cellulaire dilué au 1/10<sup>ème</sup> en tampon de lyse, à l'aide du kit BCA Protein Quantitation kit (Interchim) selon les instructions du fabricant.

### 6.4. Electrophorèse SDS-Page

Les lysats protéiques sont préparés en tampon de charge dénaturant et réducteur : Tris 60 mM pH 6,8, SDS 2%, glycérol 10%, bêta-mercaptoéthanol 5%, bleu de bromophénol 0,01%, puis incubés à 95°C pendant 5 min. 40 µg de lysat protéique sont ensuite déposés sur un gel d'acrylamide (Acrylamide 30% / Bisacrylamide 0.8%) à 15%. La migration est réalisée en solution de migration : Tris 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0.1%, pH 8.3, à 30 mA / gel constant dans un système d'électrophorèse Mini-Protean (Biorad).

### 6.5. Transfert

Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (activée par du méthanol), dans un système de transfert (Biorad) contenant une solution de transfert : Tris 25 mM, Glycine 192 mM, méthanol 20%, et un champ électrique constant de 30 V pendant 16 h.

### 6.6. Révélation $\gamma$ H2AX

La membrane après transfert est saturée en TBS (Tris 20mM, NaCl 500mM, pH7,5) tween 0,01% contenant du réactif WBR (Roche) dilué au 1/200<sup>ème</sup> pendant 1h sous agitation à température ambiante. Après 3 lavages successifs de 10 min en TBS-tween 0,01% sous agitation, la partie inférieure de la membrane est incubée avec l'anticorps monoclonal de souris anti- $\gamma$ H2AX (Thermo Scientific) à 1 µg/mL en TBS - WBR 1/200<sup>ème</sup> pendant 1h à température ambiante et sous agitation. La partie supérieure de la membrane est incubée avec l'anticorps polyclonal de chèvre anti-actine (Santa Cruz) à 0,05 µg/mL en TBS-tween 0,01% - lait 1% pendant 1h à température ambiante et sous agitation. Après 3 lavages successifs de 10 min en TBS-tween 0.01% sous agitation, la partie inférieure de la membrane est incubée avec un anticorps secondaire anti-souris anti-lapin couplé POD (Roche) dilué au 1/500<sup>ème</sup> en TBS-WBR 1/200<sup>ème</sup> pendant 1h à température ambiante et sous agitation. La partie supérieure de la membrane est incubée avec un anticorps secondaire de lapin anti-chèvre couplé HRP (Jackson ImmunoResearch) dilué au 1/5000<sup>ème</sup> en TBS-tween 0,01% - lait 1% pendant 1h à

température ambiante et sous agitation. Après 3 lavages successifs de 10 min en TBS-tween 0,01% sous agitation, les membranes sont révélées à l'aide du kit de chemiluminescence Immobilon Western (Millipore) et l'analyse densimétrique est réalisée à l'aide du logiciel Bio-1D (Vilber Lourmat).

### **6.7. Révélation LC3B**

La membrane après transfert est saturée en TBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5) tween 0,01% contenant 5% de lait écrémé pendant 1h sous agitation à température ambiante.

Après 3 lavages successifs de 10 min en TBS-tween 0,01% sous agitation, la partie inférieure de la membrane est incubée avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-LC3B (Sigma) à 1 µg/mL en TBS-tween 0.01% - lait 1% pendant 1h à température ambiante et sous agitation.

La partie supérieure de la membrane est incubée avec l'anticorps polyclonal de chèvre anti-actine (Santa Cruz) à 0,05 µg/mL en TBS-tween 0,01% - lait 1% pendant 1h à température ambiante et sous agitation. Après 3 lavages successifs de 10 min en TBS-tween 0.01% sous agitation, la partie inférieure de la membrane est incubée avec un anticorps secondaire de mouton anti-lapin couplé HRP (Chemicon) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> en TBS-tween 0,01% - lait 1% pendant 1h à température ambiante et sous agitation. La partie supérieure de la membrane est incubée avec un anticorps secondaire de lapin anti-chèvre couplé HRP (Jackson ImmunoResearch) dilué au 1/5000<sup>ème</sup> en TBS-tween 0,01% - lait 1% pendant 1h à température ambiante et sous agitation. Après 3 lavages successifs de 10 min en TBS-tween 0,01% sous agitation, les membranes sont révélées à l'aide du kit de chemiluminescence Immobilon Western (Millipore) et l'analyse densimétrique est effectuée à l'aide du logiciel Bio-1D (Vilber Lourmat).

### **7. Test de clonogénicité**

Les cellules irradiées ou non irradiées sont diluées puisensemencées en plaques 96 puits à fond rond à des concentrations de 30, 10, 3, 1 et 0,3 cellules/puits. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> pendant environ 20 jours, jusqu'à ce que les colonies soient visibles. Le nombre de puits contenant des colonies est alors compté au microscope. La fréquence de pousse des cellules est ensuite calculée d'après la loi de Poisson.

### **8. Mesure de la viabilité cellulaire par alamar Blue**

L'Alamar Blue (Invitrogen) est un réactif permettant d'évaluer quantitativement la viabilité et la prolifération des cellules de mammifères, sur la base de la détection de l'activité métabolique. Les cellules sontensemencées en plaques 96 puits à fond plat avant ajout

d'Alamar Blue (1/10<sup>e</sup> du volume de culture) et incubation à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, pendant 6 h. Les mesures de fluorescence sont ensuite réalisées avec un filtre d'excitation de 544 nm et un filtre d'émission de 590 nm sur un lecteur de fluorescence Fluoroskan Ascent (Thermo Scientific).

## **9. Annexine V / 7-AAD**

Les marquages sont réalisés selon le protocole du fournisseur (BD Annexin V-PE Apoptosis detection kit). Les cellules sont lavées dans du PBS, remises en suspension à 10<sup>6</sup> cellules/mL dans du tampon de liaison 1X (10 mM HEPES/NaOH (pH 7,4) 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>) puis réparties en tubes FACS à raison de 100 µL par tube. Ensuite, 5 µL d'Annexine V-PE et/ou 5 µL de 7-AAD sont ajoutés et les suspensions sont incubées 15 min à température ambiante dans l'obscurité. Enfin, 400 µL de tampon de liaison sont ajoutés et les échantillons sont analysés immédiatement au cytomètre de flux FACSCalibur (BD Pharmingen) à l'aide du logiciel FlowJo (Tree Star, Inc).

## **10. Analyse de la fragmentation de l'ADN**

L'extraction de l'ADN génomique des cellules est faite grâce au kit NucleoSpin® (Macherey-Nagel), les échantillons obtenus sont ensuite déposés sur gel d'agarose 1,5% pour migration par électrophorèse à 30 V. L'ajout de réactif GelRed (FluoProbes) permet de révéler l'ADN par fluorescence en plaçant le gel sur une table UV. La présence d'une « échelle » d'ADN fragmenté est caractéristique du phénomène d'apoptose.

## **11. Détection de la Caspase 3 activée**

La détection de la Caspase 3 activée est réalisée selon les instructions du fournisseur (PE Active Caspase-3 Apoptosis kit, BD Pharmingen). Les cellules sont lavées une fois en PBS puis remises en suspension dans le tampon de fixation/perméabilisation et incubées sur glace pendant 20 min. Après 2 lavages dans le tampon de lavage, les cellules sont marquées avec l'anticorps anti-caspase 3 activée couplé PE pendant 30 min à température ambiante. Un minimum de 50.000 événements est analysé en cytométrie de flux à l'aide d'un FACSCalibur et du logiciel FlowJo (TreeStar).

## **12. Préparation des échantillons pour la microscopie électronique en transmission**

Les cellules sont centrifugées et remises en suspension dans 2 mL de tampon de fixation (tampon phosphate 0,1 M pH 7,2 ; glutaraldéhyde 1,6%) puis incubées au minimum 1h30 à

4°C. Les cellules sont ensuite centrifugées, remises en suspension dans 400 µL de tampon de fixation et conservées à 4°C jusqu'à l'analyse.

### **13. Quantification des DAMPs**

Les DAMPs sont dosés par test ELISA des surnageant de culture. Les ELISA contre Hsp 70 (R&D system) et HMGB1 (IBL International) sont réalisés selon les protocoles des fournisseurs.

## Résultats

### 1. Radiobiologie des $\alpha$ dans le myélome multiple

Afin d'investiguer l'impact des radiations  $\alpha$  sur le myélome multiple nous avons choisi d'étudier les effets du bismuth-213 ( $^{213}\text{Bi}$ ) sur les lignées tumorales 5T33 (MM murin) et LP-1 (MM humain) *in vitro*. Notre équipe a en effet développé un modèle préclinique de RIT  $\alpha$  utilisant un anticorps anti-CD138 couplé au  $^{213}\text{Bi}$  pour traiter un MM induit par l'injection intraveineuse de 5T33 chez des souris syngéniques immunocompétentes (C57Bl/KaLwRij) (Chérel et al. 2013).

Le  $^{213}\text{Bi}$  est un radiométal émetteur de particules  $\alpha$  issu de la décroissance radioactive de l'actinium-225 ( $^{225}\text{Ac}$ ). Il peut être couplé à une protéine à l'aide d'un chélate bifonctionnel tel que l'acide trans-cyclohexyldiéthylènetriamine pentaacétique (CHX-A''-DTPA, Figure 20). Ce chélate forme une cage moléculaire capable de capturer des métaux, ici le  $^{213}\text{Bi}$ , afin de les fixer à la protéine voulue. Pour notre étude, nous avons choisi de coupler le bismuth à l'albumine de sérum bovin (BSA). Le couplage à la BSA permet une distribution homogène du radionucléide sur les cellules *in vitro* sans avoir à utiliser un anticorps spécifique pour chaque lignée étudiée.

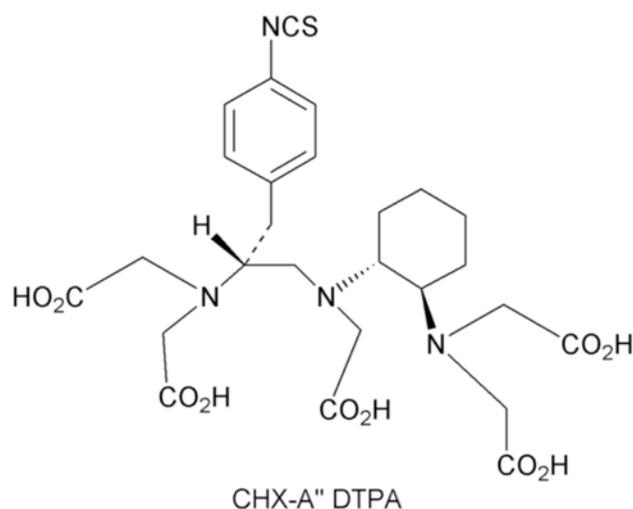


Figure 20 : Structure du CHX-A'' DTPA

(Brechbiel 2008)

Le  $^{213}\text{Bi}$  est obtenu à partir d'un générateur  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$  qui consiste en une colonne de résine sur laquelle est fixée l'actinium-225 qui produit du bismuth-213 par désintégration

radioactive (Figure 21). L'actinium-225 ayant une demi-vie de 10 jours, chaque générateur ne peut être utilisé que quelques semaines. Le bismuth est élué de la colonne à l'aide d'une solution acide avant de marquer la BSA couplée au CHX-A''-DTPA. Après purification du  $^{213}\text{Bi}$ -BSA, l'irradiation s'effectue en ajoutant le radioconjugué à la culture cellulaire.

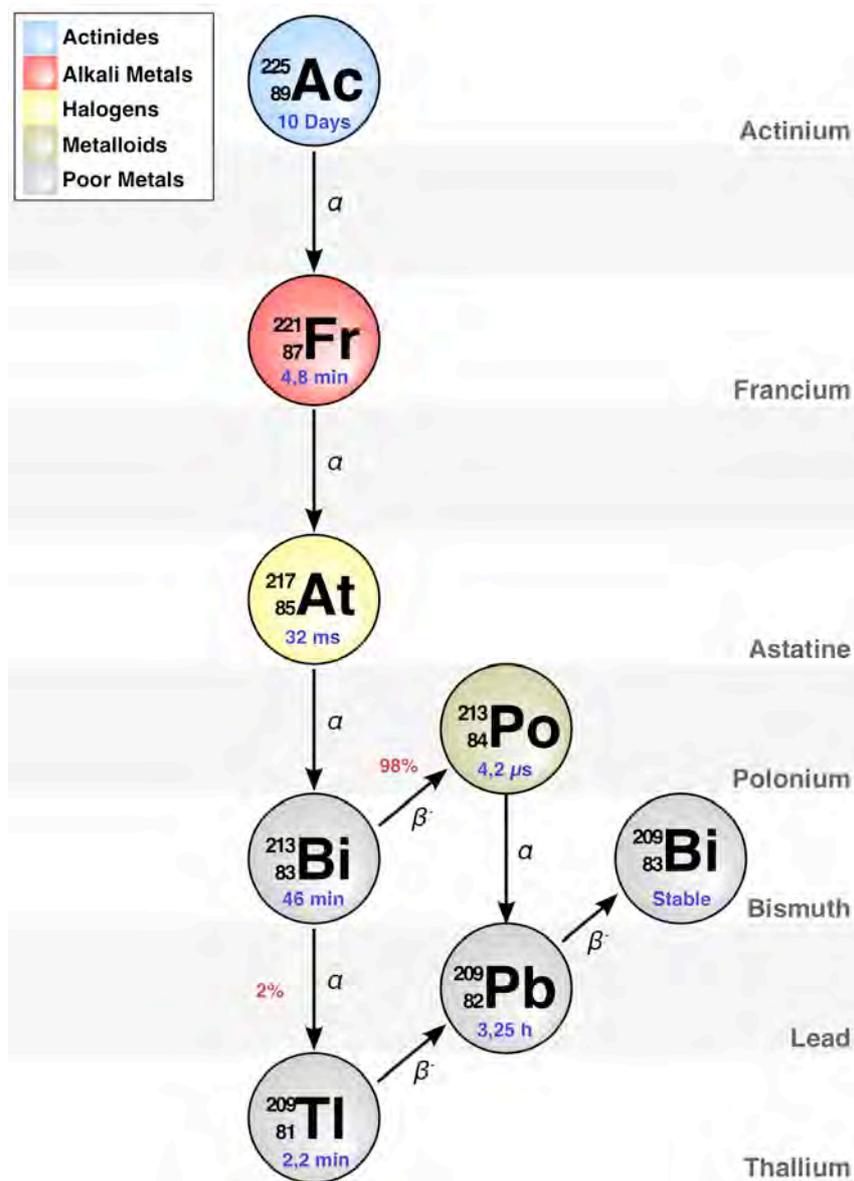
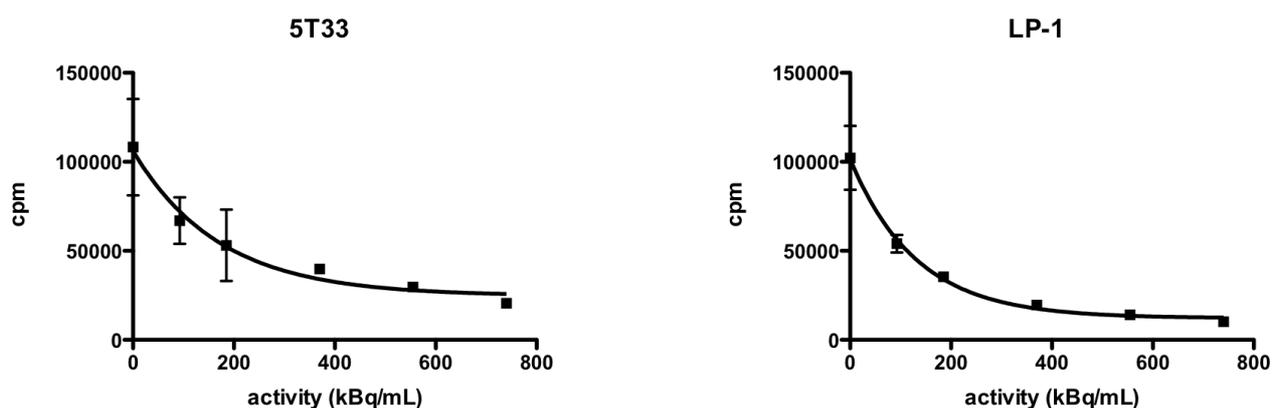


Figure 21 : Schéma de désintégration de l'actinium-225

### 1.1. Le bismuth-213 bloque la prolifération des lignées de myélome multiple

L'irradiation par le  $^{213}\text{Bi}$  inhibe l'incorporation de thymidine tritiée par les lignées 5T33 et LP-1 (Figure 22). Les cellules qui prolifèrent incorporent de la  $^3\text{H}$ -thymidine au moment de la

réplication de leur ADN, le suivi de l'incorporation par mesure de la radioactivité liée au tritium permet donc d'évaluer la prolifération cellulaire. L'inhibition de l'incorporation de thymidine par le  $^{213}\text{Bi}$  démontre une diminution de la synthèse d'ADN et indique donc une diminution de la prolifération des cellules irradiées. Cette diminution est dose dépendante et nous avons choisi, pour la suite de l'étude, d'utiliser une activité radioactive entraînant l'inhibition de plus de 80% de la pousse cellulaire 48h après irradiation. Ceci nous permet d'étudier les effets des rayonnements  $\alpha$  dans des conditions où toutes les cellules ne sont pas stérilisées par l'irradiation. Les expériences réalisées à partir de différents générateurs  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$  nous ont ainsi permis de définir une activité de 370 kBq/mL pour 5T33 et de 425 kBq/mL pour LP-1 qui ont été utilisées pour la suite de l'étude.



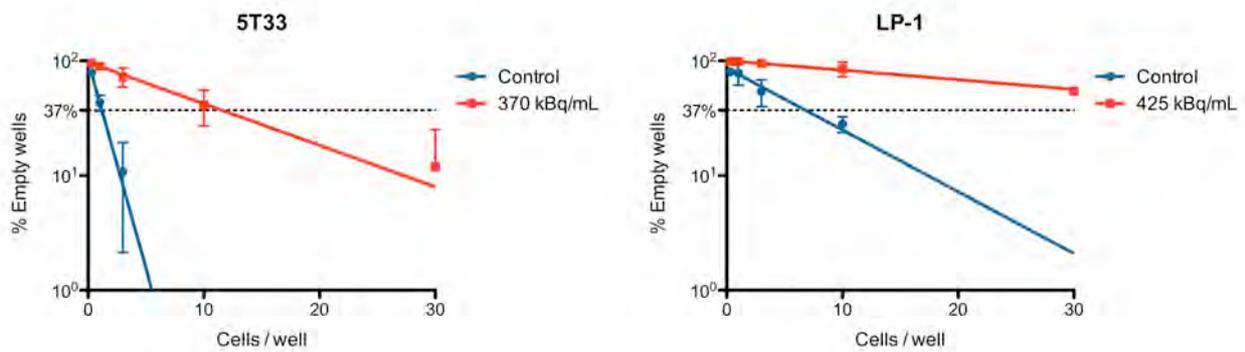
**Figure 22 : Incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine en fonction de l'activité de  $^{213}\text{Bi}$  ajoutée aux cellules**

On observe une décroissance exponentielle de l'incorporation de thymidine tritiée, et donc de la prolifération cellulaire, avec l'augmentation de l'activité radioactive. Ce test a été réalisé à l'arrivée de chaque nouveau générateur  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$  afin de contrôler que l'activité utilisée permettait à chaque fois une inhibition de la prolifération de plus de 80% des cellules à 48h.

Afin de déterminer si l'effet observé sur la prolifération était corrélé avec un effet sur la survie des cellules tumorales, nous avons réalisé des tests de clonogénicité. Ce test consiste à ensemençer les cellules irradiées en condition clonale pour mesurer l'impact de l'irradiation sur la fréquence de pousse des cellules. Les activités de bismuth choisies entraînent effectivement une diminution de la survie clonale supérieure à 80% : la survie est réduite de 86% pour la 5T33 et de 97,5% pour LP-1 (Figure 23). L'analyse de la prolifération par

incorporation de de thymidine tritiée permet donc bien d'estimer la mortalité cellulaire dans ce contexte.

Le test de clonogénicité est très utile car il permet de connaître l'impact de l'irradiation sur chaque cellule tumorale, cependant, les résultats ne sont obtenus que 2 à 3 semaines après l'irradiation soit à peu près la durée de vie d'un générateur  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ . Pour contrôler que l'activité utilisée pour l'irradiation entraînait bien au moins 80% d'inhibition de la pousse tumorale et qu'il n'y avait pas de variation entre chaque générateur, nous avons donc choisi de réaliser les tests d'incorporation de thymidine tritiée, permettant une réponse rapide en 48h, à l'arrivée de chaque nouveau générateur, et par conséquent le déroulé des autres expérimentations.



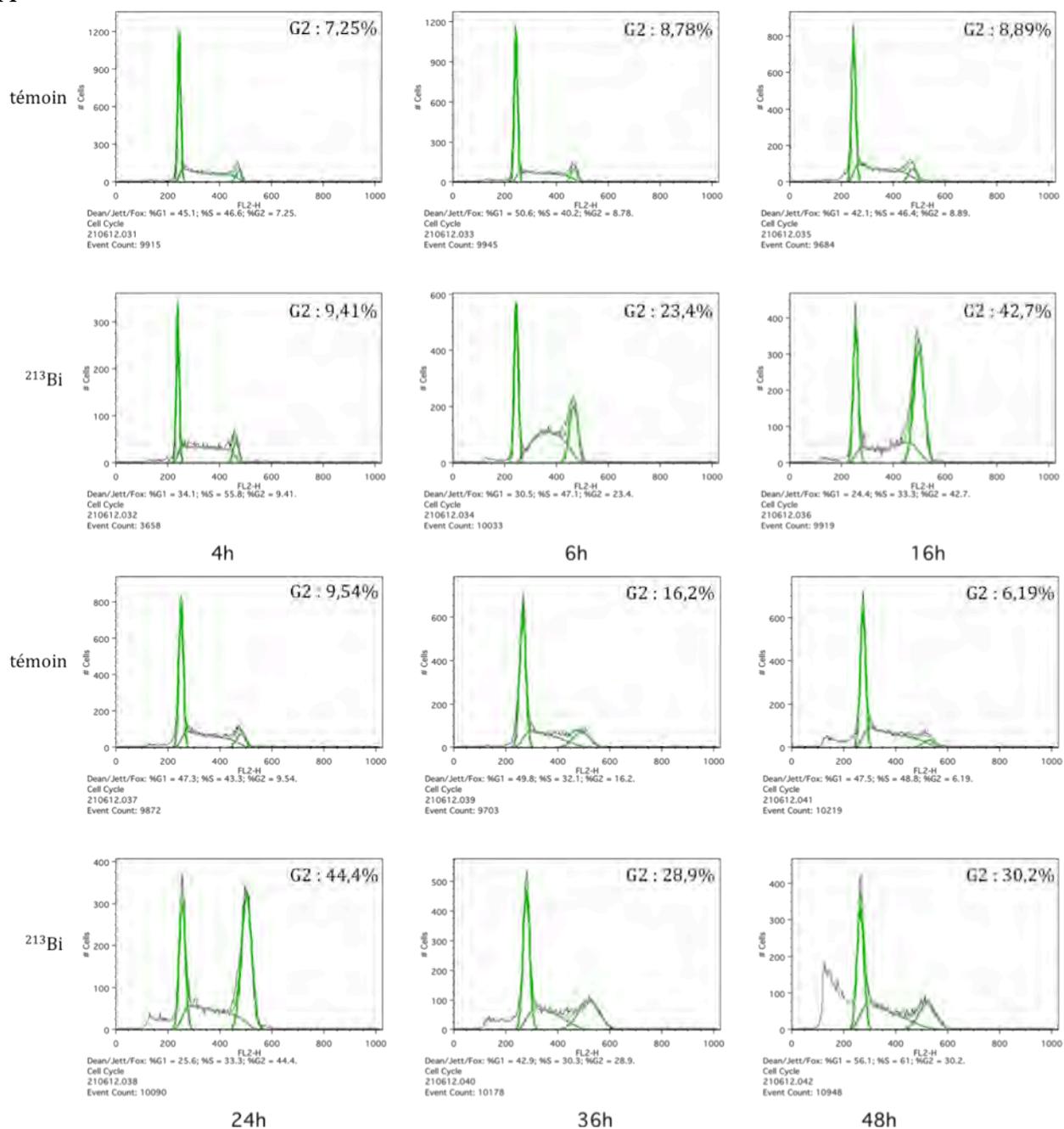
	5T33		LP-1	
	témoin	$^{213}\text{Bi}$	témoin	$^{213}\text{Bi}$
Fréquence de pousse	83,3%	8,6%	14,6%	1,9%
<i>Inhibition de la pousse par rapport au témoin</i>		89,6%		97,7%

**Figure 23 : Diminution de la survie clonale après irradiation au  $^{213}\text{Bi}$**

Les cellules sont ensemencées en conditions clonales par dilution limite et leur fréquence de pousse est calculée 2 à 3 semaines plus tard selon la loi de Poisson (à 37% de puits vides, le nombre de cellules ensemencées correspond à l'inverse de la fréquence de pousse). Les données présentées sont le résultat de 3 expériences indépendantes.

L'analyse du cycle cellulaire après irradiation a montrée que la baisse de prolifération observée était due à un blocage du cycle cellulaire (Figure 24). On observe en effet une rapide accumulation des cellules dans la phase G2 après l'irradiation. Le blocage du cycle est observable dès 4h après l'ajout du  $^{213}\text{Bi}$  dans la culture cellulaire et atteint un maximum autour de 16 à 24h pour la lignée 5T33 et entre 16 et 36h pour LP-1. Passé cette période, la proportion de cellules en G2 semble diminuer. Ceci peut s'expliquer par 2 phénomènes : soit les cellules meurent, on observe en effet une augmentation de la population sub-G1, soit les cellules finissent par reprendre leur cycle et repassent donc en phase G1 après la mitose.

A



B

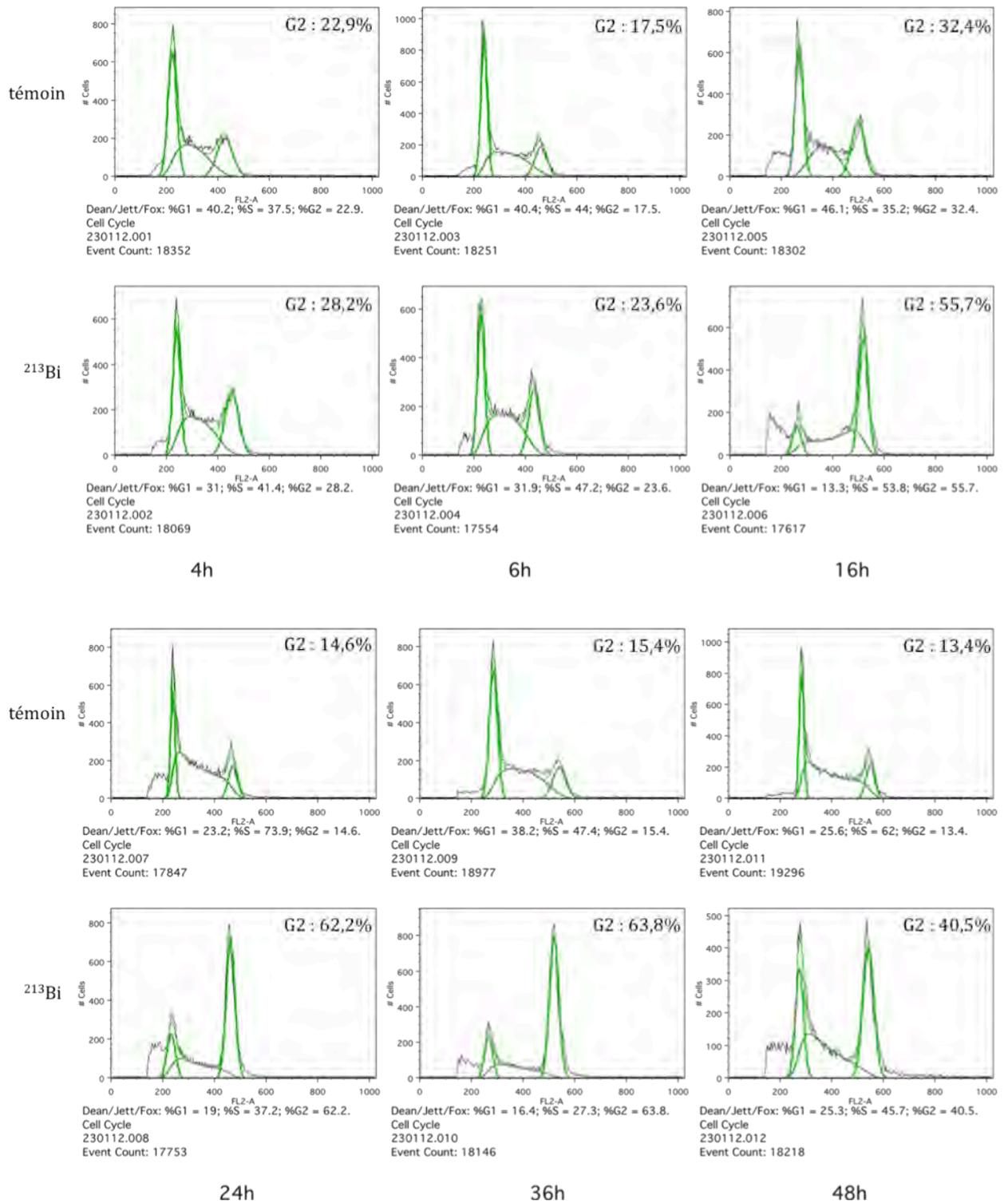


Figure 24 : Analyse du cycle cellulaire après irradiation au  $^{213}\text{Bi}$

Analyse de la quantité d'acide nucléique réalisée par cytométrie de flux après marquage de l'ADN à l'iodure de propidium pour la lignée 5T33 (A) et la lignée LP-1 (B). Pour chaque temps, les cellules non irradiées (panneau du haut) et irradiées au  $^{213}\text{Bi}$  (panneau du bas) ont été analysées. L'analyse du cycle cellulaire a été réalisée à l'aide du logiciel FlowJo selon la modélisation Dean/Jett/Fox.

L'arrêt du cycle cellulaire peut survenir en réponse aux dommages à l'ADN pour laisser le temps aux mécanismes de réparation de l'ADN de restaurer l'intégrité du matériel génétique. Lorsque des cassures double brin sont détectées, cela entraîne la phosphorylation de l'histone H2AX. Il est donc possible de détecter la présence de cassures double brin dans l'ADN à l'aide d'anticorps dirigés contre  $\gamma$ H2AX (Kuo & L.-X. Yang 2008). Des Western blot contre  $\gamma$ H2AX réalisés à différents temps après irradiation au  $^{213}\text{Bi}$  ont révélé une augmentation de la présence de H2AX phosphorylée au cours du temps (Figure 25). Seuls les résultats pour la lignée LP-1 sont présentés, les western blots pour la lignée 5T33 n'ont pas encore été réalisés. L'augmentation de la quantité de  $\gamma$ H2AX indique l'induction de cassures double brin. Cependant, la cinétique de leur apparition ne peut correspondre avec une mise en place des mécanismes de réparation de l'ADN qui bloquerait le cycle cellulaire. En effet, le blocage du cycle en G2 survient dès les premières heures qui suivent l'irradiation alors que l'augmentation de  $\gamma$ H2AX n'est observable qu'à partir de 48h après le traitement au  $^{213}\text{Bi}$ , lorsque les cellules commencent à mourir (augmentation de la population sub G1). Il a été montré que H2AX est également phosphorylée lors de l'apoptose (Solier & Pommier 2009), cette augmentation tardive de  $\gamma$ H2AX pourrait donc témoigner de l'induction d'apoptose dans les cellules tumorales irradiées. Nous nous sommes donc ensuite intéressés aux mécanismes de mort cellulaire intervenant après l'irradiation au  $^{213}\text{Bi}$ .

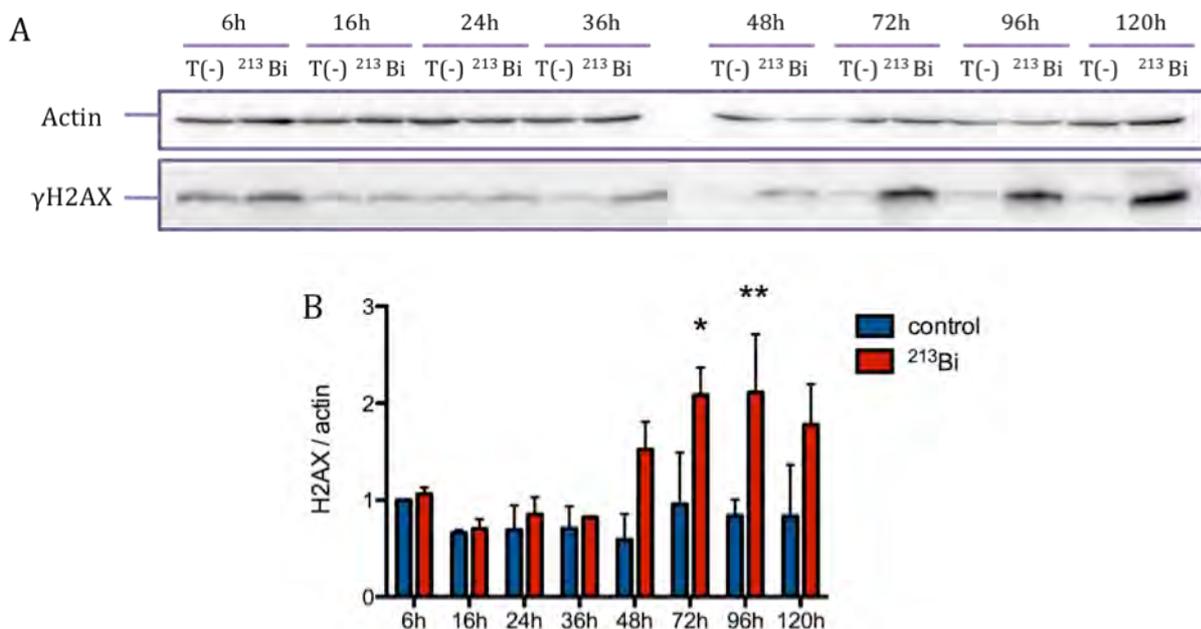


Figure 25 : Induction de cassures double brin après irradiation

A, Western blots pour la protéine phosphorylée  $\gamma$ H2AX après irradiation au  $^{213}\text{Bi}$  de la lignée LP-1. B, Analyse densimétrique réalisée par le logiciel Bio-1D. Les données présentées sont la moyenne de 2 expériences indépendantes et les barres d'erreur représentent l'écart-type. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$

## 1.2. Analyse des mécanismes de mort cellulaire survenant après l'irradiation au $^{213}\text{Bi}$

Peu d'études se sont intéressées aux mécanismes de mort cellulaire intervenant après une irradiation par des émetteurs de particules  $\alpha$  et leurs résultats sont parfois contradictoires. Les mécanismes mis en jeu sont peut-être dépendants des conditions d'irradiation (flux de particules, radionuclide libre ou vectorisé), de l'émetteur  $\alpha$  choisi, et semblent en tout cas dépendants de la lignée cellulaire étudiée. Notre équipe a en effet montré une augmentation de l'expression de l'antigène apo 2.7, caractéristique de l'apoptose, après une irradiation par le bismuth-213 pour certaines lignées de MM humain (notamment LP-1) mais pas pour d'autre (U266) (Supiot 2005). Il est donc important de caractériser les effets des particules  $\alpha$  pour chaque lignée tumorale utilisée.

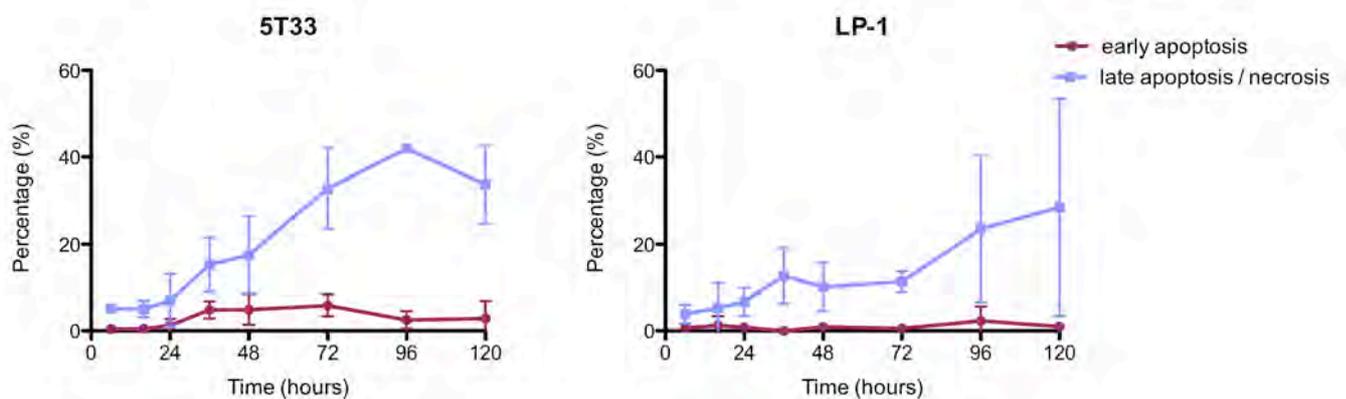
Les tests de clonogénicité nous montrent que plus de 80% des cellules exposées sont tuées par le  $^{213}\text{Bi}$  aux activités utilisées. Cependant, des tests à l'alarmar blue n'indiquent pas de diminution notable de la viabilité cellulaire jusqu'à 72h après l'irradiation (Figure 26), la mort cellulaire intervient donc tardivement.



**Figure 26 : Viabilité cellulaire après irradiation au  $^{213}\text{Bi}$**

L'alarmar blue est un indicateur de viabilité réduit par les cellules dont le métabolisme est actif. La réduction de l'alarmar blue peut être suivie par colorimétrie. Les données présentées sont la moyenne d'au moins 2 expériences indépendantes. Les barres d'erreur représentent l'écart type.

Pour déterminer le type de mort cellulaire induits par l'irradiation, nous avons réalisé un marquage Annexine V / 7-AAD à différents temps après l'ajout du  $^{213}\text{Bi}$  dans les cultures. Dans les cellules en début d'apoptose les molécules de phosphatidylsérine sont transloquées à la face externe de la membrane plasmique par un mécanisme de retournement des phospholipides de la bicouche lipidique. L'Annexine V est une protéine possédant une forte affinité pour les phosphatidylsérine et permet donc, une fois couplée à un fluorochrome, de détecter les cellules engagées dans un programme d'apoptose. La 7-amino-actinomycine D (7-AAD) est un colorant vital, exclu par les cellules dont la membrane est intacte. Ce test permet donc de discriminer les cellules en apoptose précoce des cellules en nécrose ou en apoptose tardive. La mort cellulaire intervient en effet assez tardivement et atteint son maximum 96h après l'irradiation pour la lignée 5T33 et pas avant 120h pour LP-1 (Figure 27). Le pourcentage maximum de cellules mortes observé ne dépasse cependant pas 45% alors que l'on sait que plus de 80% des cellules ne survivent pas à l'irradiation sur le long terme. D'après les tests d'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine, certaines cellules continuent de proliférer 48h après l'irradiation, si ces cellules se divisent cela peut diminuer le pourcentage apparent de cellules tuées par le  $^{213}\text{Bi}$ . De plus, il est possible que certaines cellules continuent de proliférer quelque jours avant de mourir par catastrophe mitotique. Ce mécanisme de mort cellulaire peut en effet survenir après plusieurs divisions cellulaires (Castedo et al. 2004).



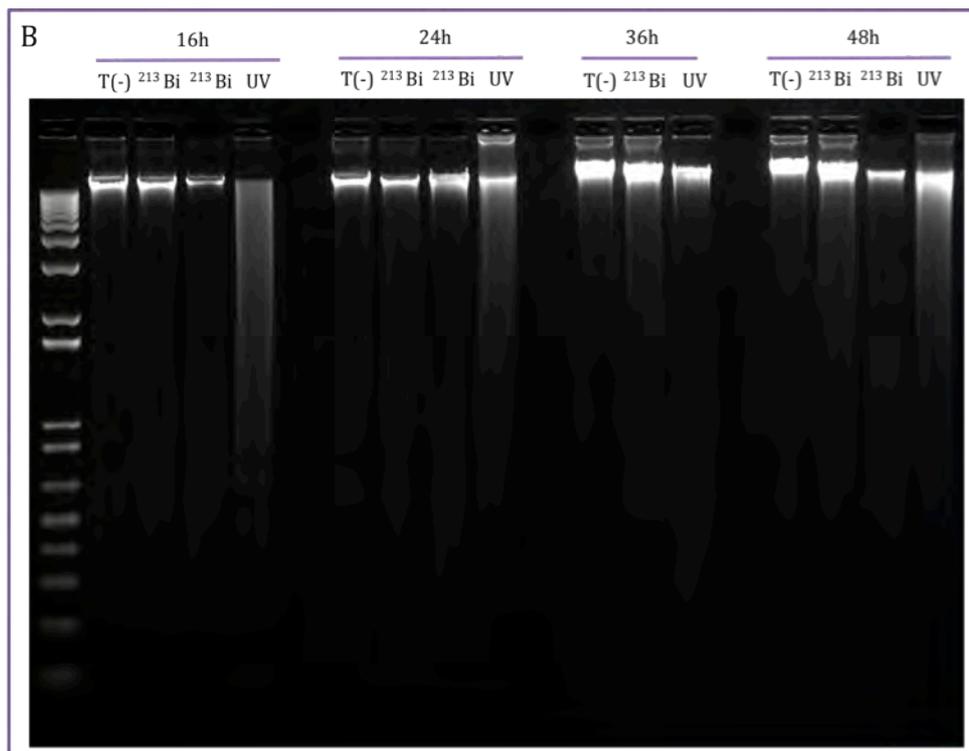
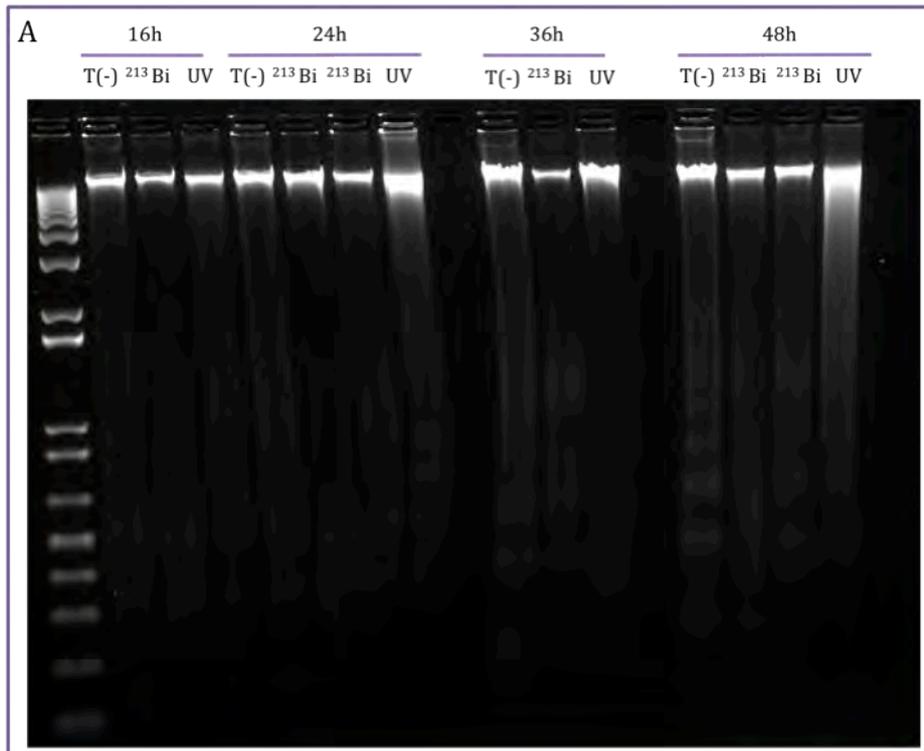
**Figure 27 : Suivi de la mort cellulaire après irradiation au  $^{213}\text{Bi}$**

Les cellules Annexines V<sup>+</sup> sont considérées en apoptose précoce alors que les cellules Annexine V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup> sont considérées comme nécrotiques ou en apoptose tardive. Les données présentées sont la moyenne d'au moins 2 expériences indépendantes. Les barres d'erreur représentent l'écart type.

Nous n'avons observé que très peu d'apoptose précoce, ce qui semble indiquer que les cellules meurent préférentiellement par nécrose. Pour confirmer ces résultats nous avons réalisé des gels d'électrophorèse de l'ADN génomique des cellules tumorales après irradiation. Lors du processus apoptotique, l'ADN génomique des cellules est en effet clivé à intervalle régulier par des protéines caspases ce qui donne un aspect « d'échelle d'ADN » après migration sur gel d'électrophorèse. En contrôle positif, les cellules tumorales ont été irradiées par une source externe d'UV-B, ces rayonnements sont en effet connus pour induire une mort par apoptose.

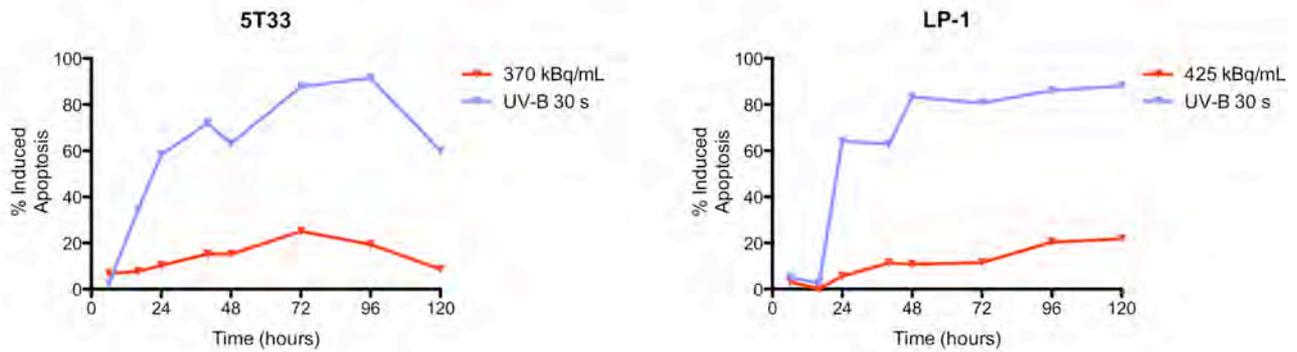
Nous avons en effet observé des échelles d'ADN (qui apparaissent plus comme des smears sur l'image) pour les échantillons irradiés par les UV-B. En revanche, de telles échelles n'apparaissent pas pour les échantillons irradiés au  $^{213}\text{Bi}$  (Figure 28). Toutefois, cette technique n'est pas très résolutive, il est donc possible qu'un faible niveau d'apoptose ne puisse pas être détecté de cette manière. Ces résultats suggèrent donc que s'il y a induction d'apoptose, cela ne constitue pas le mécanisme majeur de mort cellulaire.

Pour compléter notre étude nous avons effectué un test de détection de la caspase-3 activée. Cette protéine est activée lors du processus d'apoptose. En contrôle positif, nous avons ici aussi utilisé les UV-B qui ont entraîné l'activation de la caspase-3 dans plus de 80% des cellules irradiées pour 5T33 comme pour LP-1 (Figure 29). Pour les 2 lignées, le pourcentage de cellules présentant une activation de la caspase-3 a atteint plus de 20% des cellules irradiées par le  $^{213}\text{Bi}$ , ce qui est inférieur au pourcentage total de cellules mortes détectées par le marquage Annexine V/7-AAD (jusqu'à plus de 40%) mais supérieur au pourcentage de cellules marquées par l'annexine V seulement (inférieur à 6%). L'induction d'apoptose ne peut donc pas expliquer la totalité de la mortalité observée mais semble participer en partie à la mort cellulaire induite par l'irradiation au  $^{213}\text{Bi}$ . Il est en fait probable que l'irradiation entraîne plusieurs processus de mort cellulaire au sein de l'ensemble de la population irradiée, les mécanismes déterminant quelle voie de mortalité empruntera chaque cellule individuellement reste cependant à élucider.



**Figure 28 : Électrophorèse de l'ADN génomique après irradiation au  $^{213}\text{Bi}$**

Électrophorèse de l'ADN génomique de cellules 5T33 (A) et LP-1 (B) après irradiation par le  $^{213}\text{Bi}$  ou par des rayons UV-B.

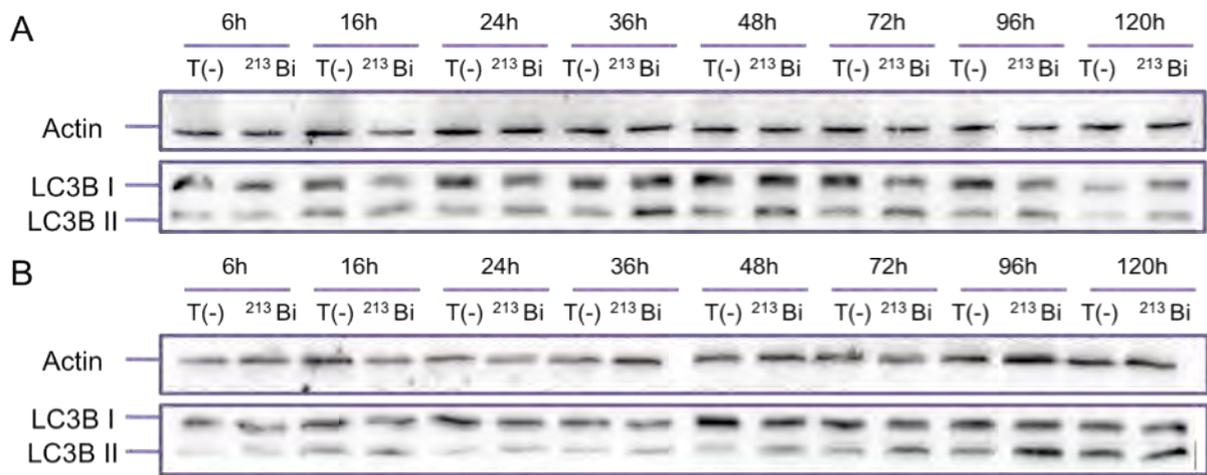


**Figure 29 : Pourcentage d'apoptose induite après irradiation par  $^{213}\text{Bi}$  ou UV**

Les graphiques représentent le pourcentage de cellules exprimant la forme activée de la caspase-3 détectée par cytométrie de flux. Les résultats sont normalisés par rapport au témoin non irradié pour chaque temps de la cinétique (% de cellules caspase-3<sup>+</sup> - % de cellules caspase-3<sup>+</sup> du témoin). Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois.

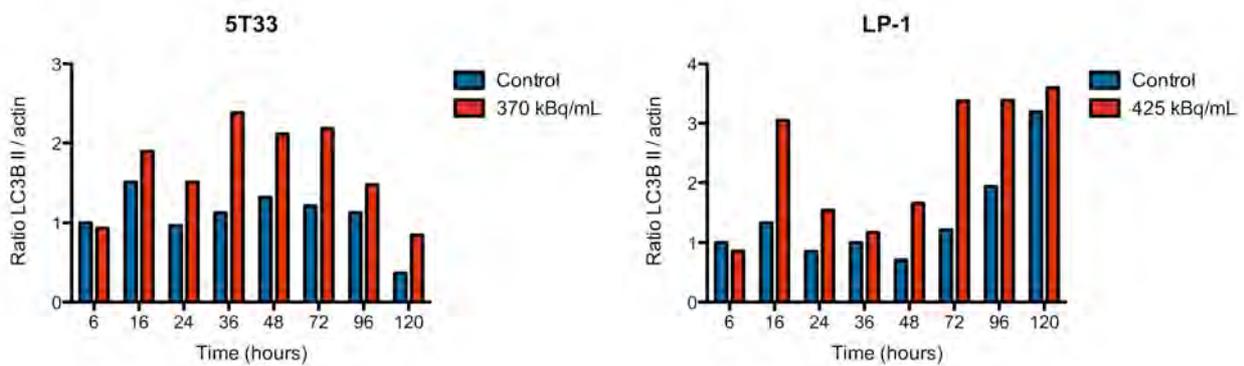
### 1.3. Analyse de l'autophagie après irradiation

Le rôle de l'autophagie dans le traitement du cancer est sujet à débat. Certaines études montrent que l'autophagie contribue à la radiorésistance des cellules tumorales (Lomonaco et al. 2009; Chaachouay et al. 2011) alors que d'autres montrent que l'autophagie participe à la mort cellulaire et à la radiosensibilisation (K. W. Kim et al. 2009; Chang et al. 2012). De plus, aucune étude à notre connaissance, n'a investigué l'effet des particules  $\alpha$  sur l'autophagie et des résultats préliminaires obtenus dans l'équipe ont montré une augmentation de l'expression de DRAM, un gène impliqué dans l'autophagie, sur des lymphocytes T après irradiation par l'astate-211 et le bismuth-213 (résultats non publiés). Nous avons donc réalisé des western blots pour la forme conjuguée de la protéine LC3B (LC3B-II), dont la présence est corrélée à celle des autophagosomes, à différents temps après l'irradiation par le  $^{213}\text{Bi}$ . Nos résultats, analysés en normalisant la quantité de la forme LC3B-II par rapport à la quantité d'actine et non pas par rapport à la forme LC3B-I (Mizushima & Yoshimori 2007; Barth et al. 2010), montrent une augmentation de la quantité de LC3B-II après l'irradiation (Figure 30 et Figure 31) ce qui suggère que les particules  $\alpha$  induisent l'autophagie dans les cellules de MM. La présence des autophagosomes, reconnaissable grâce à leur double membrane lipidique, a ensuite été confirmée par microscopie électronique en transmission (Figure 33 et Figure 33) (Ylä-Anttila et al. 2009).



**Figure 30 : Augmentation de la quantité de LC3B-II après irradiation au <sup>213</sup>Bi**

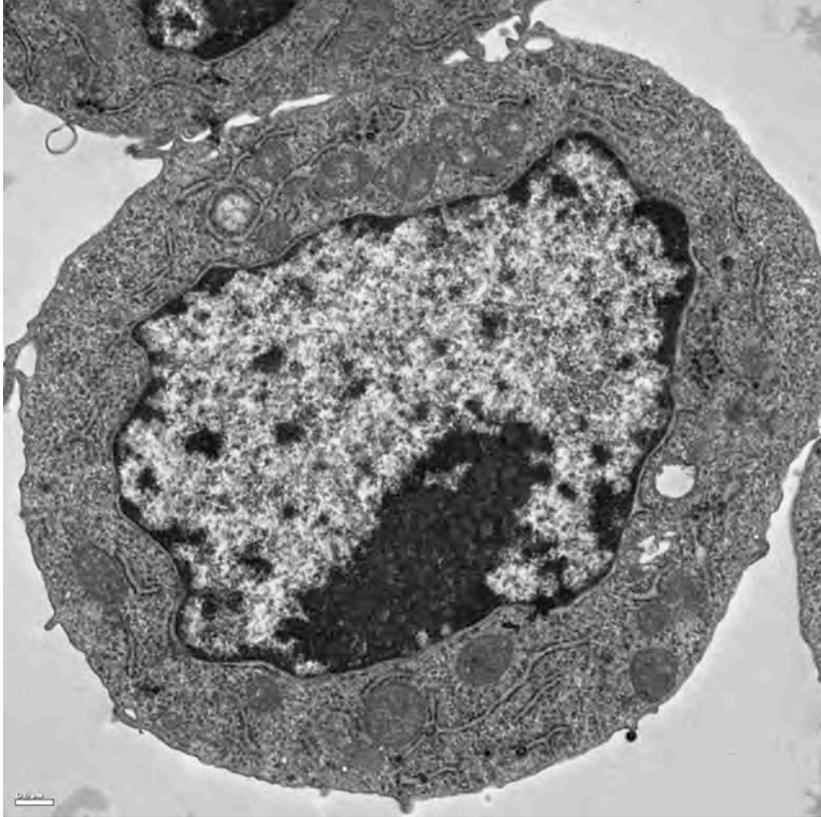
Western blot pour la protéine LC3B après irradiation de 5T33 (A) et LP-1 (B) au <sup>213</sup>Bi. Les blots pour la protéine actine ont été réalisés en contrôle. Les résultats présentés sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.



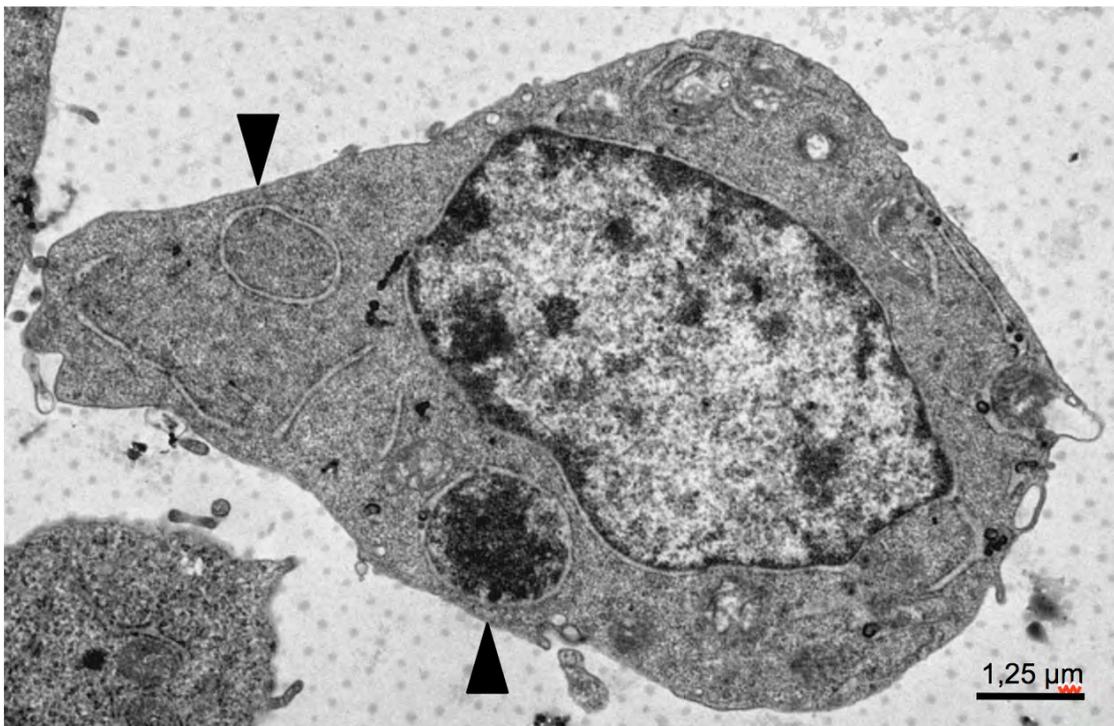
**Figure 31 : Quantification densimétriques du signal LC3B-II**

La quantification densimétrique du signal LC3B-II normalisée par rapport à l'actine a été réalisée grâce au logiciel Bio-1D. Les résultats présentés sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

A



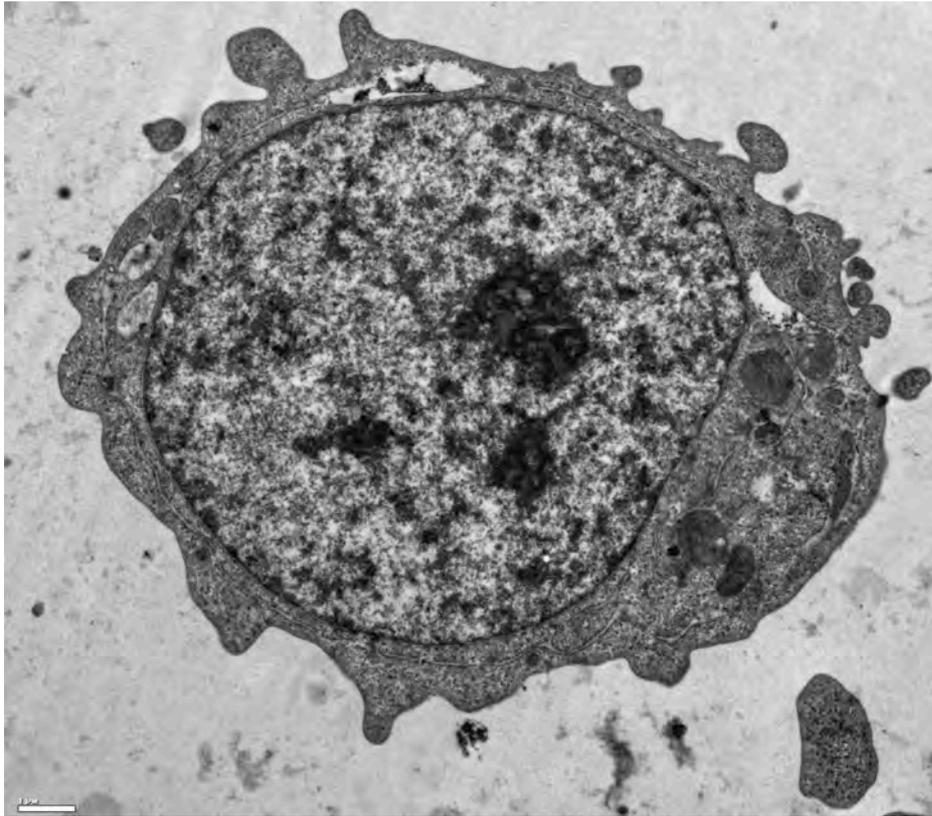
B



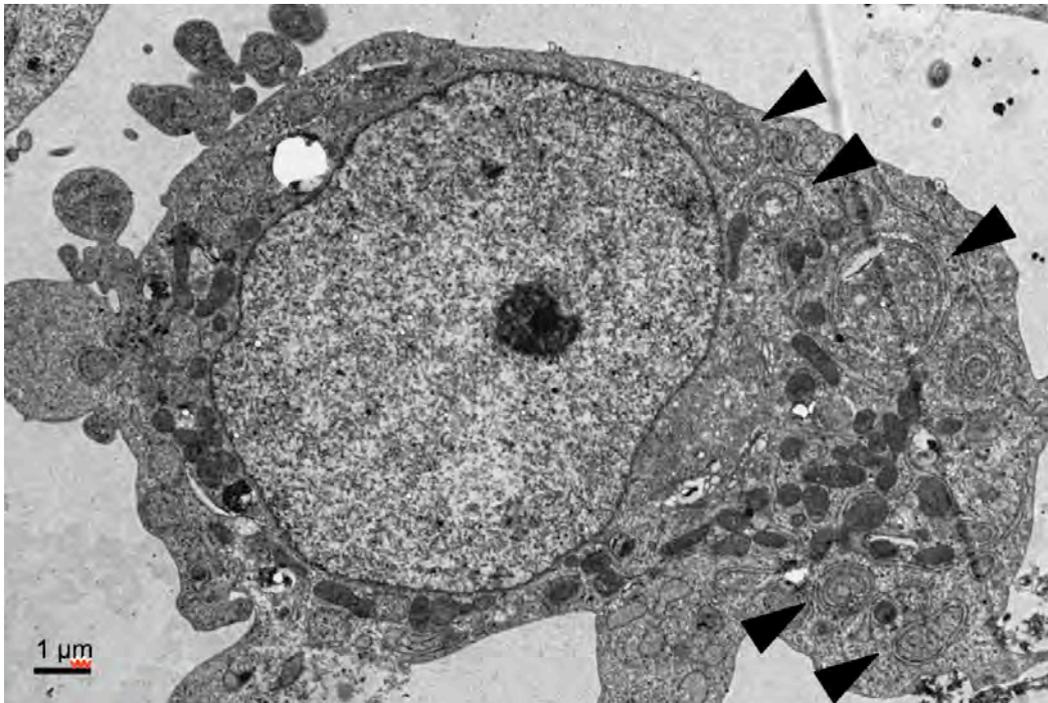
**Figure 32: Identification des autophagosomes par microscopie électronique en transmission**

Les autophagosomes, reconnaissable à leur double membrane lipidique, sont indiqués par les fêches. Cellules 5T33 à 48h sans traitement (A) ou après irradiation au  $^{213}\text{Bi}$  (B).

A



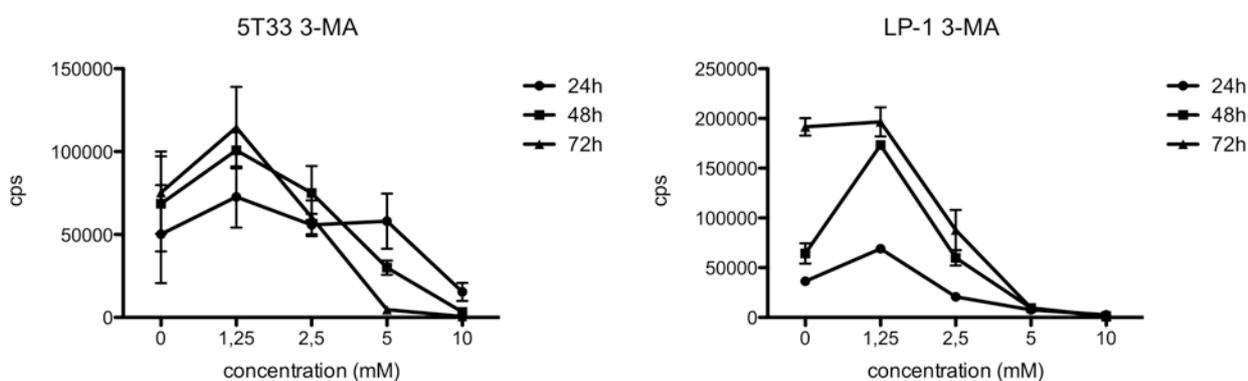
B



**Figure 33 : Identification des autophagosomes par microscopie électronique en transmission**

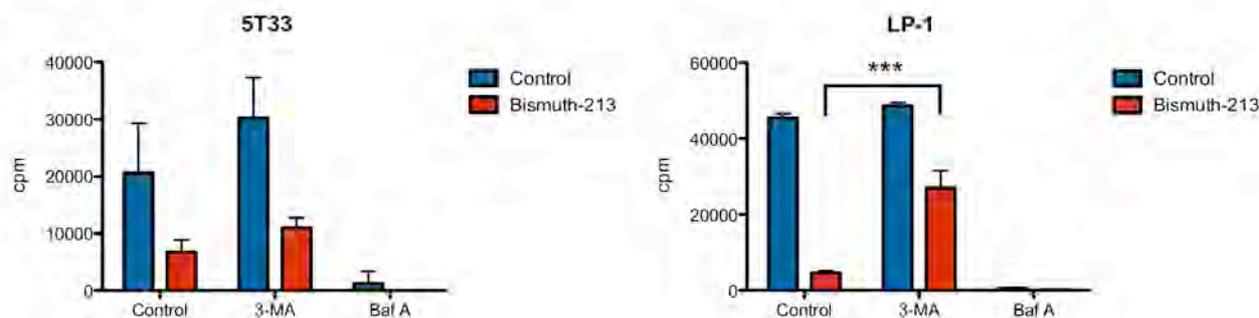
Les autophagosomes, reconnaissable à leur double membrane lipidique, sont indiqués par les fêches. Cellules LP-1 à 72h sans traitement (A) ou après irradiation au  $^{213}\text{Bi}$  (B).

Compte tenu des données contradictoires sur le rôle de l'autophagie, nous avons cherché à déterminer si l'autophagie, dans notre contexte de réponse à l'irradiation  $\alpha$ , était activée en tant que processus de survie ou au contraire de mort cellulaire. Pour cela nous avons traité les cellules tumorales avec des inhibiteurs de l'autophagie en combinaison avec l'irradiation au  $^{213}\text{Bi}$ . La 3-méthyladénine (3-MA) inhibe l'induction de l'autophagie (Seglen & Gordon 1982) *via* son action inhibitrice sur la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) de classe III essentielle à la formation des autophagosomes (Backer 2008; Jaber et al. 2012). La Bafilomycine A1 permet de bloquer la fusion entre les autophagosome et les lysosomes ce qui entraîne un blocage de la phase finale de l'autophagie (Yamamoto et al. 1998). Ces 2 inhibiteurs permettent donc de moduler l'autophagie à des stades différents : la 3-MA inhibe l'initiation du processus alors que la Bafilomycine inhibe la dégradation des autophagosomes. La concentration d'utilisation du 3-MA (1,25 mM) a été déterminée pour ne pas inhiber la prolifération cellulaire (Figure 34). Pour l'utilisation de la Bafilomycine, nous nous sommes basés sur la concentration utilisée dans différentes publications (Rothenberg et al. 2010; Del Bello et al. 2013). Cependant, dans nos conditions d'expériences, la Bafilomycine inhibe la prolifération des 2 lignées tumorales étudiées (Figure 35). Le blocage de la fusion avec les lysosomes entraînant l'accumulation des autophagosomes semble donc toxique pour les cellules cancéreuses.



**Figure 34 : Impact de la 3-MA sur la prolifération cellulaire**

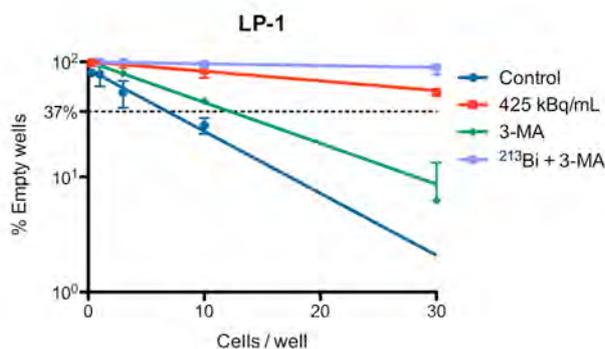
Étude de l'effet de la 3-MA sur l'incorporation de thymidine tritiée à différentes concentrations. La concentration de 1,25 mM a été choisie pour le reste de l'étude car elle n'induit pas de diminution de la prolifération cellulaire pour les lignées étudiées.



**Figure 35 : Impact de l'autophagie sur la prolifération cellulaire après irradiation au <sup>213</sup>Bi**

Tests d'incorporation de <sup>3</sup>H-thymidine réalisés 48h après irradiation au <sup>213</sup>Bi en présence ou non d'inhibiteurs pharmacologiques de l'autophagie. Les données présentées sont la moyenne de 4 mesures et les barres d'erreurs représentent l'écart type. Les résultats présentés sont représentatifs de 2 expériences indépendantes. \*\*\* p<0,001  
3-MA : 3-méthyladénine ; Baf A : Bafilomycine A1

L'inhibition de l'autophagie par la 3-MA n'a pas eu d'effet significatif sur l'incorporation de <sup>3</sup>H-thymidine après irradiation au <sup>213</sup>Bi pour la lignée 5T33 mais a en revanche significativement protégé les cellules LP-1 contre l'effet de l'irradiation (Figure 35). Nous n'avons cependant pas contrôlé l'effet de la 3-MA sur l'autophagie, il est donc possible que la concentration appliquée soit suffisante pour inhiber l'autophagie dans la lignée LP-1 mais pas pour la lignée 5T33. Dans le cas de la lignée LP-1, l'autophagie semble participer à l'effet du <sup>213</sup>Bi sur la prolifération des cellules. Pour confirmer ces observations, nous avons réalisé des tests de clonogénicité après irradiation en présence ou non de 3-MA. Nous n'avons pas observé d'impact de l'inhibition de l'autophagie sur la survie à long terme des cellules irradiées par le <sup>213</sup>Bi (Figure 36). Cependant, lors du test de clonogénicité, les cellules sont mises en culture pendant environ 3 semaines et il est possible que l'inhibiteur 3-MA soit dégradé au cours du temps et ne permette d'inhiber l'autophagie que sur une durée limitée. Cette expérience n'exclue donc pas un rôle de l'autophagie dans la mortalité cellulaire de la lignée LP-1 en réponse à l'irradiation par le <sup>213</sup>Bi et il sera nécessaire d'investiguer plus en détails les liens entre l'autophagie et la mortalité des cellules irradiées par le <sup>213</sup>Bi.

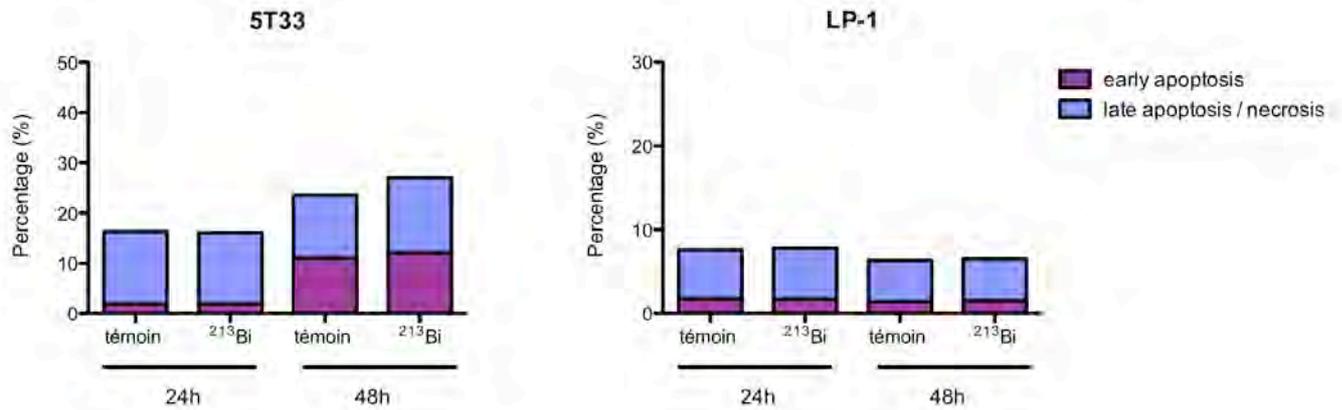


**Figure 36 : Impact de l'autophagie sur la survie clonale après irradiation au <sup>213</sup>Bi**

Les cellules sont ensemencées en conditions clonales par dilution limite et leur fréquence de pousse est calculée 3 semaines plus tard selon la loi de Poisson. L'inhibiteur 3-MA est ajouté 2h avant l'irradiation puis de nouveau le lendemain, lorsque les cellules sont ensemencées en conditions clonales. Les données présentées sont le résultat de 3 expériences indépendantes.

#### 1.4. Analyse de l'effet bystander après irradiation au <sup>213</sup>Bi

Une partie de la mortalité cellulaire observée après l'irradiation peut aussi être due à l'effet bystander. Il a en effet déjà été montré pour des particules alpha que les cellules non touchées par l'irradiation pouvaient également être tuées (Nagasawa & Little 1992; Boyd et al. 2006). Afin d'étudier l'effet bystander associé à l'irradiation par le <sup>213</sup>Bi, nous avons réalisé des expériences de transfert de milieu de culture conditionné après l'irradiation. Le milieu de culture de cellules tumorales irradiées a été transféré 24h après l'ajout du <sup>213</sup>Bi sur des cellules tumorales non irradiées et la mortalité cellulaire a ensuite été analysée par marquage Annexine V / DAPI 24h et 48h après le transfert. Nous n'avons pas observé d'induction de mort cellulaire suite au transfert de milieu conditionné et donc pas d'effet bystander (Figure 37). Cependant, la plupart des études concernant l'effet bystander réalisent des transferts beaucoup plus précoces après l'irradiation (de 1 à 4h après irradiation), il est donc possible que les facteurs induisant la mort cellulaire dans ces études aient une durée de vie trop courte pour provoquer un effet que nous puissions dans nos conditions expérimentales. De plus, il a été montré que l'effet bystander consécutif à l'irradiation par des particules  $\alpha$  était, au moins en partie, transmis par des jonctions intercellulaires (Autsavapromporn et al. 2011) et un tel effet ne peut être évalué par des transferts de milieu conditionné.



**Figure 37 : Analyse de l'effet bystander après irradiation au <sup>213</sup>Bi**

Analyse de la mortalité cellulaire par double marquage Annexine V / DAPI 24h et 48h après transfert de milieu conditionné (milieu de culture de cellules tumorales irradiées 24h après l'ajout du <sup>213</sup>Bi) sur des cellules tumorales non irradiées.

En résumé, cette étude radiobiologique montre que l'irradiation par le <sup>213</sup>Bi induit un arrêt de la prolifération cellulaire par un blocage du cycle cellulaire en phase G2. Ce blocage conduit finalement, après plusieurs jours, à la mort cellulaire. L'irradiation par cet émetteur de particules  $\alpha$  semble également induire de l'autophagie chez les cellules tumorales irradiées et cette autophagie pourrait avoir un rôle dans l'arrêt initial de la prolifération cellulaire et dans la mortalité induite par l'irradiation. L'apoptose et la nécrose sont également impliquées dans la mortalité cellulaire suivant l'irradiation par le <sup>213</sup>Bi mais les mécanismes menant à l'un ou l'autre de ces processus de mort cellulaire et leur lien avec l'autophagie restent à élucider.

## 2. Les $\alpha$ : inducteurs de mort immunogène

### 2.1. Article

En soumission à Cancer Research.

#### **Anti-tumour immunity induced after alpha irradiation**

Jean-Baptiste Gorin<sup>1,2,3</sup>, Jérémie Ménager<sup>1,2,3</sup>, Sébastien Gouard<sup>1,2,3</sup>, Catherine Maurel<sup>1,2,3</sup>, Yannick Guilloux<sup>1,2,3</sup>, Alain Faivre-Chauvet<sup>1,2,3,5</sup>, Alfred Morgenstern<sup>6</sup>, Frank Bruchertseifer<sup>6</sup>, Michel Chérel<sup>1,2,3,4</sup>, François Davodeau<sup>1,2,3</sup> and Joëlle Gaschet<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> INSERM UMR 892 - CRCNA, <sup>2</sup> University of Nantes, <sup>3</sup> CNRS UMR 6299, Nantes, France

<sup>4</sup> Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint-Herblain, France

<sup>5</sup> CHU Nantes, Nuclear medicine department, Nantes, France

<sup>6</sup> Institute for Transuranium Elements, Karlsruhe, Germany

#### **Abstract**

Radioimmunotherapy (RIT) is a therapeutic modality that allows delivering of ionizing radiation directly to targeted cancer cells. Conventional RIT uses beta-emitting radioisotopes, but recently a growing interest has emerged for the clinical development of alpha particles. Alpha emitters are ideal for killing isolated or small clusters of tumour cells, thanks to their specific characteristics (high linear energy transfer (LET) and short path in the tissue), and their effect is less dependent on dose rate, tissue oxygenation or cell cycle status than gamma and X-rays. Several studies have been performed to describe alpha emitter radiobiology and cell death mechanisms induced after alpha irradiation. But so far, no investigation has been undertaken to analyze the impact of alpha particles on the immune system, when several studies have shown that external irradiation, using gamma and X-rays can foster an anti-tumour immune response. Therefore, we decided to evaluate the immunogenicity of murine adenocarcinoma MC-38 after bismuth-213 (<sup>213</sup>Bi) irradiation using a vaccination approach. *In vivo* studies performed in immunocompetent C57Bl/6 mice induced a protective anti-tumour response that is mediated by tumour specific T cells. The molecular mechanisms potentially involved in the activation of adaptative immunity were also investigated by *in vitro* studies.

We observed that  $^{213}\text{Bi}$  treated MC-38 cells release "danger signals" and activate dendritic cells. Our results demonstrate that alpha irradiation can stimulate adaptive immunity, elicits an efficient anti-tumour protection and therefore is an immunogenic cell death (ICD) inducer, which provides an attractive complement to its direct cytolytic effect on tumour cells.

## Introduction

Radiotherapy is one of the most common treatment of cancer and has been efficiently used for decades. Ionizing radiation is used to eradicate cancer cells through direct cytotoxicity potentially associated with a bystander and other non-targeted effects (1-3). Numerous radiotherapy modalities have been developed, among which RIT is one of the most promising for the treatment of disseminated cancers. RIT is an internal form of radiotherapy using radiolabelled vectors to target tumour antigens expressed on tumour cells (4). This therapeutic approach has significantly progressed over the past 20 years with the development of new vectors, improvement of labelling efficiencies and availability of new radionuclides (5). Among those, alpha particles are very attractive for clinical development. Indeed, the physical and biological characteristics of those radioisotopes appear to be especially suited for targeting isolated cancer cells, small clusters of tumour cells or micrometastasis. Alpha particles exhibit a high LET ( $\sim 100 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ) with an energy comprised in between 5 and 9 MeV and a short path of 50 to 90  $\mu\text{m}$  in the tissues. Like other high LET particles, alpha emitters induce more DNA double strand breaks (DSBs) than gamma or X-rays and provoke a cell cycle arrest in the G2 phase that is more marked than with gamma rays (6,7). It has been shown that irradiation of the nucleus with a few alpha particles is sufficient to result in cell death (8) and only a few dozens are needed when the membrane is targeted whereas several thousands of beta emitters are required for the same effect (9). Furthermore, radiobiological effects associated to alpha radionuclides are advantageously less sensitive to dose rate, hypoxia, and cell cycle distribution than beta particles or gamma rays (10). Other aspects of alpha emitter radiobiology have been less investigated. For instance, few studies have analyzed cell death mechanisms and those are sometimes conflicting. Some groups showed that cells undergo apoptosis following exposure to alpha particles (11,12) when others observed cell death independent from apoptosis (13,14).

However, it has become increasingly clear that direct cytotoxicity is not the only factor accounting for tumour destruction by ionizing radiation *in vivo*. Indirect effects such as radiation-induced biologic bystander effects (RIBBEs) significantly contribute to the effectiveness of irradiation (15) and numerous studies have demonstrated that external treatment with gamma and X-rays can have a beneficial effect at distance from the field of irradiation. This phenomenon is called abscopal effect and has been shown to be mediated by the immune system (16,17). Accumulating evidence also show that the immune response may play an important role in patient response to radiation (18). Several mechanisms have been proposed to explain the implementation of such an anti-tumour response after radiotherapy. First, irradiation induces local inflammation of tumour sites and microenvironment that favours the recruitment of immune cells, in particular dendritic cells (DCs). Additionally, DCs are capable of cross-presenting antigens from the tumour cells killed by irradiation to stimulate a specific T cell response. Finally, the stress induced by ionizing radiation provides the immune system with signals, called "danger signals" or Danger Associated Molecular Patterns (DAMPs), needed for activation of antigen presenting cells (APC) such as DCs (19). These results, obtained in animals after external irradiation, underline the importance of studying the impact of ionizing radiation on immune cells and their potential in stimulating an immune response that could complement the direct effect of irradiation and establish a long term anti-tumour response. Nevertheless, the influence of alpha radiation on immunity has not been investigated so far.

Therefore, our study aims to investigate the potential of  $^{213}\text{Bi}$ , an alpha emitter generated from an actinium-225 ( $^{225}\text{Ac}$ )/ $^{213}\text{Bi}$  generator, in stimulating immune cells. We used MC-38 tumour cells, a murine adenocarcinoma, which has been reported to be weakly immunogenic and a good model for immunotherapy studies (20,21). In order to study the impact of the radioelement on the tumour cells only without irradiating the microenvironment and without any vectorization that could also act on the tumour cells, we chose a vaccination approach in immunocompetent C57Bl/6 mice. Additional *in vitro* studies were conducted to investigate the molecular mechanisms involved after MC-38 irradiation on the activation of adaptative immunity, in particular DCs and T cells, and the establishment of long-term protection towards tumour cells. Here, we report for the first time that tumour cells irradiated with an alpha particle emitter lead to the development of a long lasting anti-tumour immune response mediated by specific T cells *in vivo*. We also demonstrate *in vitro* that irradiation of MC-38

cells with  $^{213}\text{Bi}$  induces the release of DAMPs (i.e. Hsp70 and HMGB1) and triggers the activation of DCs.

## Materials and methods

**Cell culture.** MC-38 murine colon carcinoma (established by Rosenberg's lab, National Cancer Institute, Bethesda, MD (20); and kindly provided by Dr. Pèlerin, CRLC Val d'Aurelle-Paul Lamarque, Montpellier, France) and B16-F10 murine melanoma (ATCC : CRL-6475) were maintained in DMEM (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (PAA), 2 mM glutamine (Gibco), 100 U/mL penicillin and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin (Gibco) at 37°C and 5%  $\text{CO}_2$ .

**Bismuth-213 irradiation.** CHX-A"-DTPA (cyclohexyl diethylene triamine penta-acetic acid; Macrocyclus) was conjugated to Bovine Serum Albumin (BSA) as previously described (22) and controlled by indium labelling. For labelling with  $^{213}\text{Bi}$ , conjugated BSA was incubated with  $^{213}\text{Bi}$  eluted from a  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$  generator (Institute for Transuranium Elements, Karlsruhe, Germany) for 10 min at 37°C in 0.6 M sodium acetate (pH 5.3) and 0.01% ascorbic acid. The resulting  $^{213}\text{Bi}$ -BSA conjugate was purified from unbound  $^{213}\text{Bi}$  by size exclusion chromatography using a PD-10 column (GE Healthcare). Radiochemical purity was >95%, as determined by ITLC-SG using 0.1 M citrate buffer (pH 4.5). A solution containing  $^{213}\text{Bi}$ -BSA diluted in culture media was then added to the cells at a final activity of 2.22 MBq/mL of  $^{213}\text{Bi}$  for vaccination and 0.74 MBq/mL for *in vitro* studies.

**Mice and vaccination.** Wild type C57Bl/6 (H-2<sup>b</sup>) mice aged between 11 and 17 weeks and 14 weeks old nude mice (Janvier Labs) were immunized with  $3 \times 10^6$  irradiated MC-38 injected s.c. in the left flank. The injection was performed 6 hours after tumour cell irradiation to allow for complete radioactive decay of  $^{213}\text{Bi}$  before injection, thus limiting irradiation of the mice. Seven days later, mice were challenged with  $2 \times 10^5$  live MC-38 s.c. in the right flank. Tumour progression was then assessed regularly using calipers and mice were euthanized when tumour volume reached 2 500  $\text{mm}^3$  or when signs of tumour necrosis were observed. Experiments performed in this study were approved by the local veterinary committee (license no. CEEA.2013.2).

**T cell preparation.** Mice were sacrificed 5 days after their last injection and axillary, inguinal, popliteal and mesenteric lymph nodes were recovered. T cells were then purified using Pan T

cell isolation kit II (Miltenyi Biotec) and stimulated *in vitro* with 5 µg/mL anti-CD3ε (clone 145-2C11, eBioscience) and 2 µg/mL anti-CD28 (clone 37.51, eBioscience). T cells were then cultured until they went back to a resting state (no proliferation).

**Cytotoxic assay.** Cytotoxic activity was tested using a standard <sup>51</sup>Cr release assay. Briefly, MC-38 or B16-F10 autologous tumour cell lines were used as a target and labelled with 2.77 MBq of Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> for 1h at 37°C, washed 5 times and then plated in 96-well U-bottom plates. E:T ratios were 20:1, 10:1, 5:1, and 2.5:1. After 16h of incubation at 37°C, 25 µL of supernatant from each well were removed, mixed with 100 µL Betaplate Scint (Perkin Elmer) and read using 1450 Microbeta Plus counter (Wallac, Gaithersburg, MD). Each test was performed in triplicate. Results were expressed as a percentage of lysis according to the following formula: (experimental release - spontaneous release) / (maximal release - spontaneous release) × 100, where experimental release represents mean cpm release from target cells in the presence of effector cells, spontaneous release represents that from targets incubated without effectors and maximum release that from target cells incubated with 1% triton.

**DAMPs detection in culture media.** DAMPs release in cell culture was assessed using ELISA directed against Hsp70 (Heat Shock Protein 70) (R&D Systems) and HMGB1 (Homeostatic Group Box protein 1) (IBL International) following manufacturers' protocols.

**BMDC production.** Bone marrow cells were flushed with RPMI medium from C57Bl/6 thighbones and filtered through a 70 µm cell strainer. Adherent cells were cultured in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 10% FCS (PAA), 2 mM glutamine (Gibco), 100 unit/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Gibco), 100 µM 2-mercaptoethanol (Carl Roth), MEM non essential amino acids (Gibco) and murine GM-CSF (purified from the supernatant of a transgenic GM-CSF producing cell line (23)) to induce Bone Marrow Dendritic Cells (BMDCs) differentiation. On day 3, fresh medium was added, on day 6 and 8, half of the medium was removed and replaced by fresh medium and BMDCs were used on day 10.

**Co-culture assays.** For BMDC co-culture assay with tumour cells, 1x10<sup>6</sup> murine BMDCs were plated in 6-wells dishes with 5x10<sup>6</sup> MC-38 and incubated 24 hours at 37°C. Maturation was then analyzed by immunofluorescence phenotyping. For BMDC maturation with tumour cell supernatant, 1 mL tumour cell supernatant was added to 1x10<sup>6</sup> BMDCs and plated in 12-

wells dishes. BMDC phenotype was analyzed by immunofluorescence after 24 hours of incubation.

**Immunofluorescence analysis.** Cells were washed once in PBS-BSA 0.1% and then stained for 1 hour at 4°C with primary antibody. When secondary antibody was needed, cells were washed 3 times in PBS-BSA 0.1% before incubation with secondary antibody. After staining, cells were washed twice in PBS-BSA 0.1% and once in PBS before acquisition in flow cytometer. The following antibodies and their respective control isotypes were used in this study: Alexa647 anti-mouse CD11c (N418; eBioscience), FITC anti-mouse CD11b (M1/70; BD), FITC anti-mouse CD34 (RAM34; BD), FITC anti-mouse CD80 (16-10A1; BD), APC anti-mouse CD86 (GL1; BD), and APC anti-mouse CD40 (1C10, eBioscience). Immunofluorescence analyses were performed using BD FACScalibur flow cytometer and analyzed with FlowJo software (TreeStar).

**Data analysis.** Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. Survival data were analyzed using the log-rank test and Kaplan-Meier method. Comparisons of continuous variables were done using non-parametric Mann Whitney tests or two-way ANOVA (GraphPad Prism Version 5.0). P values of less than or equal to 0.05 are considered significant.

## Results

### **Vaccination of mice with irradiated cells induces a protective anti-tumour response *in vivo***

To determine whether alpha irradiated cells could foster an anti-tumour response *in vivo*, we conducted vaccination studies on syngeneic C57Bl/6 mice. Mice were vaccinated 7 days prior MC-38 engraftment by s.c. injection of  $3 \times 10^6$   $^{213}\text{Bi}$ -treated MC-38 (without any adjuvant), in the left flank. On day 0, mice were engrafted with  $2 \times 10^5$  live MC-38 injected s.c. in the opposite flank to make sure that any response observed would have to be systemic and not just due to local control. Among non-vaccinated controls, 21 out of the 25 mice rapidly developed a tumour and reached end-point value within 40 days (Fig 1A). On the other hand, only 3 out of 25 vaccinated mice developed a tumour (Fig 1B). Median survival was 37 days for controls and was not reached for the vaccinated group after over 100 days of monitoring. Overall survival at 73 days after live tumour cells engraftment was 88% for the vaccinated mice compared to 16% in control group (Fig 1C). This demonstrates that alpha irradiated

tumour cells are highly immunogenic and can elicit a strong anti-tumour response *in vivo* without using any adjuvant.

To follow the induced immune response, 17 mice out of the 22 mice which rejected MC-38 upon live tumour cell injection, were challenged a second time on day 73. Remarkably, 100% of the animals showed full protection by rejecting that 2<sup>nd</sup> engraftment (Fig 1D). This result demonstrates that the anti-tumour response was long-lasting, hence most likely driven by the adaptive immunity.

An additional group of 10 mice was included in the study, receiving the vaccination but not the first challenge with live MC-38 cells on day 0. Those mice were then challenged on day 73. Interestingly, among that group, 90% of the animals rejected the live tumour cell graft (data not shown). This adds to the evidence that alpha irradiated tumour cells are highly immunogenic and shows that it can elicit a long lasting immune response without any boost or adjuvant.

### **The anti-tumour response induced *in vivo* is T cell mediated**

To investigate the cell subsets involved in the anti-tumour response induced through alpha irradiated MC-38, we performed vaccination studies on immunodeficient athymic mice (*nude*), which lack T cells. We observed no protection against tumour challenge after vaccination. Kinetic of tumour development appeared very similar in all the mice (Fig 2A and 2B), and median survival was 13 days for both the control and vaccinated groups (Fig 2C), indicating that T cells are essential for the anti-tumour effect obtained through vaccination.

Cytotoxic T Lymphocytes (CTL) are known as potent effectors in anti cancer treatments, therefore we investigated the presence of CTL specifically targeted towards MC-38 following immunization. T cells were purified from the mice lymph nodes and tested through a conventional chromium release assay (Fig 3). T cells from naïve mice exhibited a weak cytotoxic efficiency towards MC-38 cells, varying from 6.7 to 11.7% independently from the effector to target ratio (Fig 3A). Similarly, cytotoxic efficiency towards another syngeneic, but nonrelated, tumour cell line (B16-F10 melanoma) was weak and did not exceed  $3.4\% \pm 3.8\%$  at any E:T ratio tested (Fig 3A). After vaccination with <sup>213</sup>Bi-irradiated MC-38 and subsequent tumour challenge a week later, a significant increase of cytotoxic efficiency towards MC-38 was observed, ranging from  $40.0\% \pm 9.7\%$  for an E:T ratio of 2.5:1 to 74.0%

$\pm 24.7\%$  for an E:T ratio of 20:1 (Fig 3B), indicating that an anti-tumour T cell response had been raised. On the contrary, cytotoxic efficiency towards B16-F10 melanoma did not increase and was only  $1.0\% \pm 1.8\%$  at the highest E:T ratio, indicating that the T cell response was specific to MC-38. Comparison of naïve, challenged, vaccinated and vaccinated + challenged mice, showed that CTL activity was only significantly increased in vaccinated + challenged mice at the E:T ratio of 10:1 with 55.9% cytotoxicity compared to 7.9% in naïve animals. Together with our data on the vaccination of *nude* mice, these results suggest that CTL are the main effector of the anti-tumour response raised after vaccination with alpha irradiated tumour cells.

### **Tumour cells treated with $^{213}\text{Bi}$ activate Dendritic Cells *in vitro***

To further explore the mechanisms supporting the anti-tumour immune response to alpha particles, we analyzed DC phenotype after *in vitro* irradiation of MC-38 cells. DCs express costimulatory molecules such as CD40, CD80 and CD86 on their cell surface, which are needed for activation of naïve T cells. Activation of immature DCs results in increased expression of those costimulatory molecules. Immature BMDCs derived from syngeneic C57Bl/6 mice have been incubated for 48 hours with conditioned media from control or  $^{213}\text{Bi}$ -treated MC-38. The media of irradiated tumour cells elicited a significant increase of 32% in CD40 expression (RFI increased from 4.5 to 5.9) and 44.8% in CD86 expression (22.7 to 32.6) and a slight increase, however not significant, of 4.4% in CD80 expression (3.3 to 3.4) on BMDCs (Fig 4A, B, C). Besides, we observed that BMDCs aggregated in clumps (Fig 4D,E) when incubated in culture inserts with irradiated MC-38, which is a phenotypic characteristic of DC activation (24). No activation was observed when immature BMDCs were exposed to irradiated culture medium only (data not shown). These results suggest that  $^{213}\text{Bi}$  induces the release of soluble agents from MC-38 capable of activating DCs *in vitro*.

### **$^{213}\text{Bi}$ irradiation causes release of DAMPs from MC-38 cells**

Then, we tested the conditioned media of  $^{213}\text{Bi}$  treated MC-38 for the presence of DAMPs. DAMPs such as Hsp70 or HMGB1 are self-molecules normally expressed intracellularly, which can be released in the extracellular space upon cell stress or damage as a danger signal to the immune system (25,26). Those molecules are known to activate DCs and have been implicated in the establishment of efficient anti-tumour response (27). ELISA on MC-38 conditioned media showed a significant increase of HMGB1 and Hsp70 levels following  $^{213}\text{Bi}$

irradiation (Fig 5). This increase in both DAMPs concentrations started 24 hours and 48 hours post-irradiation for Hsp70 and HMGB1, respectively. Altogether these data show that  $^{213}\text{Bi}$  induces the release of DAMPs from irradiated tumour cells, which may contribute to the anti-tumour response by activating DCs.

## Discussion

Radiotherapy is traditionally used for its cytotoxic effect on cancer cells. There is however growing evidence showing that direct cytotoxicity is not the only process through which radiation may contribute to tumour elimination. Here we demonstrate that alpha irradiated tumour cells are highly immunogenic and can elicit a strong anti-tumour response *in vivo* which protects immunocompetent hosts against further tumour challenge with the same tumour. Indeed 88% of the vaccinated animals survived to the injection of live MC-38 tumour cells. Alpha particles therefore fulfil the first requirement defined by Kroemer's group to be defined as an ICD inducer (28). Our results show that irradiation of tumour cells with  $^{213}\text{Bi}$  can lead to the elimination of other tumour cells in a distant site, even long after the irradiation. The protective effect of vaccination was indeed long-lasting (over 2 months) and must therefore involve memory cells. Strikingly, this immune protection was observed in all the animals subjected to a second challenge with live MC-38 cells. The response was T cell mediated as demonstrated by the presence of specific cytotoxic T cells and by the lack of protection in nude mice. This kind of specific, systemic and long lasting response would be highly desirable for anti cancer therapy since it should help in eliminating distant metastases and preventing relapse. However, T cells may not be the only cells needed for an efficient anti-tumour effect. Nude mice have functional NK cells and B cells which could participate in the immune response. Further experiments will help to clarify the role of each immune subset in the anti-tumour response.

Interestingly, tumours grew much faster in nude mice with a median survival of 13 days versus 37 days in C57Bl/6 immunocompetent mice. Moreover, 4 out of the 25 challenged mice did not develop a tumour and the rest of the challenged animals showed a slight increase in cytotoxicity against MC-38 as compared to naïve mice (however not significant). This data suggest that live tumour cells exhibit some level of immunogenicity, probably related to the fact that the MC-38 cells we used, express high levels of MHC class I molecules (data not shown). Although this immune response slows down tumour growth to some extent, it isn't

sufficient for tumour control in 84% of the animals. This could mean two things: either tumour cells multiply too quickly for the immune response to cope with it, or the immune system sees the tumour as harmless self and represses the initial anti-tumour response. In both cases, alpha radiation delivered through RIT would be of great therapeutic interest. Indeed, the high cytotoxicity of alpha particles could reduce tumour load and at the same time, alpha irradiated tumour cells could activate the immune response and tip the balance towards an effective anti-tumour response. Additional studies using less immunogenic tumours will however be required to determine whether alpha radiation would be as efficient in triggering an immune response in such settings.

To depict the mechanisms that could contribute to activation of T cells *in vivo*, we pursued *in vitro* studies on DCs. Their role in anti-cancer immunity is indeed crucial. When activated with the adequate stimuli, DCs can cross-present tumour derived antigens to T-cells and secrete stimulatory cytokines, which will lead to the establishment of an effective cell-mediated anti-tumour response. On the other hand, if not properly activated, DCs may promote tolerance and T-cell unresponsiveness. In fact, in a vast majority of cancer, the anti-tumour response is repressed by the host's immune regulatory cells (29). Here, we exposed immature BMDCs to conditioned media from irradiated MC-38 tumour cells and observed significant changes in both DC morphology and expression profile of several DC activation markers, demonstrating the potency of alpha-irradiated tumour cells in triggering immune activation.

To further investigate the molecular processes that could contribute to the activation of DCs *in vitro*, we conducted ELISA tests on the conditioned media of alpha irradiated tumour cells to detect the presence of well-characterized DAMPs (30). *In vivo*, as irradiated tumour cells were washed in PBS prior to vaccination, the molecules involved in immune cells activation cannot be irradiated molecules from the culture medium and have to be secreted by the tumour cells after exposure to  $^{213}\text{Bi}$ . Besides, irradiated culture medium alone did not induce DC activation. We showed that  $^{213}\text{Bi}$  causes the release of Hsp70 and HMGB1 from MC-38 cells. Such molecules which are normally endogenous, get released in the extracellular environment after a stress or non-physiological cell death and can activate immune cells (26,31). Heat shock proteins (HSP) are chaperones proteins capable of binding numerous peptides. The HSP-peptide complexes released from dying cells can be taken up by APC through the common receptor CD91 to allow for antigen processing and re-presentation to T

cells (32). HMGB1 is an ubiquitous non-histone nuclear factor which mediates inflammation and immune responses, when released from dying cells (33). HMGB1 production in cancer patients has conversely been reported in association with both good (34) and poor prognosis (35,36). HMGB1 has also been involved in numerous processes facilitating tumour progression, such as proliferation (37), metastasis (38,39), angiogenesis (40) and chronic inflammation (41). The differential activity of HMGB1 is related to the balance of its different redox states (ie all-thiol, disulfide and sulfonated) that are produced in the extracellular environment (42). In the case of radiotherapy, a rapid and local increase of HMGB1 might act differently on the immune system than a chronic systemic secretion. Notably, HMGB1 has been shown to be mandatory for cross-presentation of antigen derived from dying tumour cells to T-cells after radiotherapy, leading to efficient anti-tumour immune response (43). Further studies will be required to determine the importance of these DAMPs in the establishment of an immune response in our settings. Using larger screening techniques (ie mass spectrometry), it will also be important to identify other species produced after irradiation contributing to such bystander phenomena.

All these data underline the importance of the immune system in response to radiotherapy of cancer. Nevertheless, most studies on RIT efficacy are performed on xenograft models in immunodeficient mice. Therefore, the participation of the immune system in response to therapy is completely overseen. In the future, it will be of prime importance to assess the response to cancer therapy in both immunodeficient and immunocompetent models to take into account the effect of radiation on both tumour cells and the immune environment.

In conclusion, the data presented here show that irradiation of tumour cells with  $^{213}\text{Bi}$  induces the release of DAMPs, promotes DC activation and leads to a systemic and long lasting anti-tumour response. This is to our knowledge the first study demonstrating that alpha particle irradiation of tumours can lead to the establishment of an efficient anti-tumour immune response *in vivo*. Even though the impact of alpha irradiation on the immune response to cancer will have to be further characterized, this study brings new insights on the mechanism of action of alpha particles and further supports the interest in developing the use of such emitters for cancer therapy.

## **Conflict of Interest Statement**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## **Author's Contributions**

Conception and design: JB. Gorin, F. Davodeau, J. Gaschet

Development of methodology: JB. Gorin, J. Gaschet

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): JB. Gorin, J. Ménager, S. Gouard, C. Maurel, A. Faivre-Chauvet, A. Morgenstern, F. Bruchertseifer

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): JB. Gorin, J. Ménager, S. Gouard, M. Chérel, F. Davodeau, J. Gaschet

Writing, review, and/or revision of the manuscript: JB. Gorin, J. Ménager, S. Gouard, Y. Guilloux, M. Chérel, F. Davodeau, J. Gaschet

Study supervision: F. Davodeau, J. Gaschet

## **Grant support**

This work was supported by grants from La Ligue Contre le Cancer and from the Pays de la Loire Council "Nucléaire pour la Santé" (Nucsan).

JB. Gorin and J. Ménager are supported by MESR grants from the French Ministry of Research and Higher Education.

A. Morgenstern, F. Bruchertseifer are supported by the European Commission.

## **Acknowledgements**

We would like to thank Marie-Hélène Gaugler for critical review of the manuscript. We would also like to thank Sandrine Minault (CRCNA) for her technical help, as well as the UTE, Cytocell and Radioactivity facilities (SFR François Bonamy, IRS-UN, University of Nantes).

## **References**

1. Goldberg Z, Lehnert BE. Radiation-induced effects in unirradiated cells: a review and implications in cancer. *Int J Oncol.* 2002;21:337–49.

2. Morgan WF. Is there a common mechanism underlying genomic instability, bystander effects and other nontargeted effects of exposure to ionizing radiation? *Oncogene*. 2003;22:7094–9.
3. Mothersill C, Seymour CB. Radiation-induced bystander effects--implications for cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2004;4:158–64.
4. Barbet J, Bardiès M, Bourgeois M, Chatal J-F, Chérel M, Davodeau F, et al. Radiolabeled antibodies for cancer imaging and therapy. *Methods Mol. Biol*. 2012;907:681–97.
5. Sharkey RM, Goldenberg DM. Cancer radioimmunotherapy. *Immunotherapy*. 2011;3:349–70.
6. Lücke-Huhle C. Alpha-irradiation-induced G2 delay: a period of cell recovery. *Radiation Research*. 1982;89:298–308.
7. Yong KJ, Milenic DE, Baidoo KE, Brechbiel MW. <sup>212</sup>Pb-Radioimmunotherapy Induces G2 Cell-Cycle Arrest and Delays DNA Damage Repair in Tumor Xenografts in a Model for Disseminated Intraperitoneal Disease. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2012;11:639–48.
8. Søyland C, Hassfjell SP. Survival of human lung epithelial cells following in vitro alpha-particle irradiation with absolute determination of the number of alpha-particle traversals of individual cells. *Int J Radiat Biol*. 2000;76:1315–22.
9. Humm JL, Cobb LM. Nonuniformity of tumor dose in radioimmunotherapy. *J. Nucl. Med*. 1990;31:75–83.
10. Sgouros G, Roeske JC, McDevitt MR, Palm S, Allen BJ, Fisher DR, et al. MIRD Pamphlet No. 22 (Abridged): Radiobiology and Dosimetry of  $\alpha$ -Particle Emitters for Targeted Radionuclide Therapy. *J. Nucl. Med*. 2010;51:311–28.
11. Seideman JH, Stancevic B, Rotolo JA, McDevitt MR, Howell RW, Kolesnick RN, et al. Alpha particles induce apoptosis through the sphingomyelin pathway. *Radiation Research*. 2011;176:434–46.
12. Friesen C, Roscher M, Hormann I, Leib O, Marx S, Moreno J, et al. Anti-CD33-

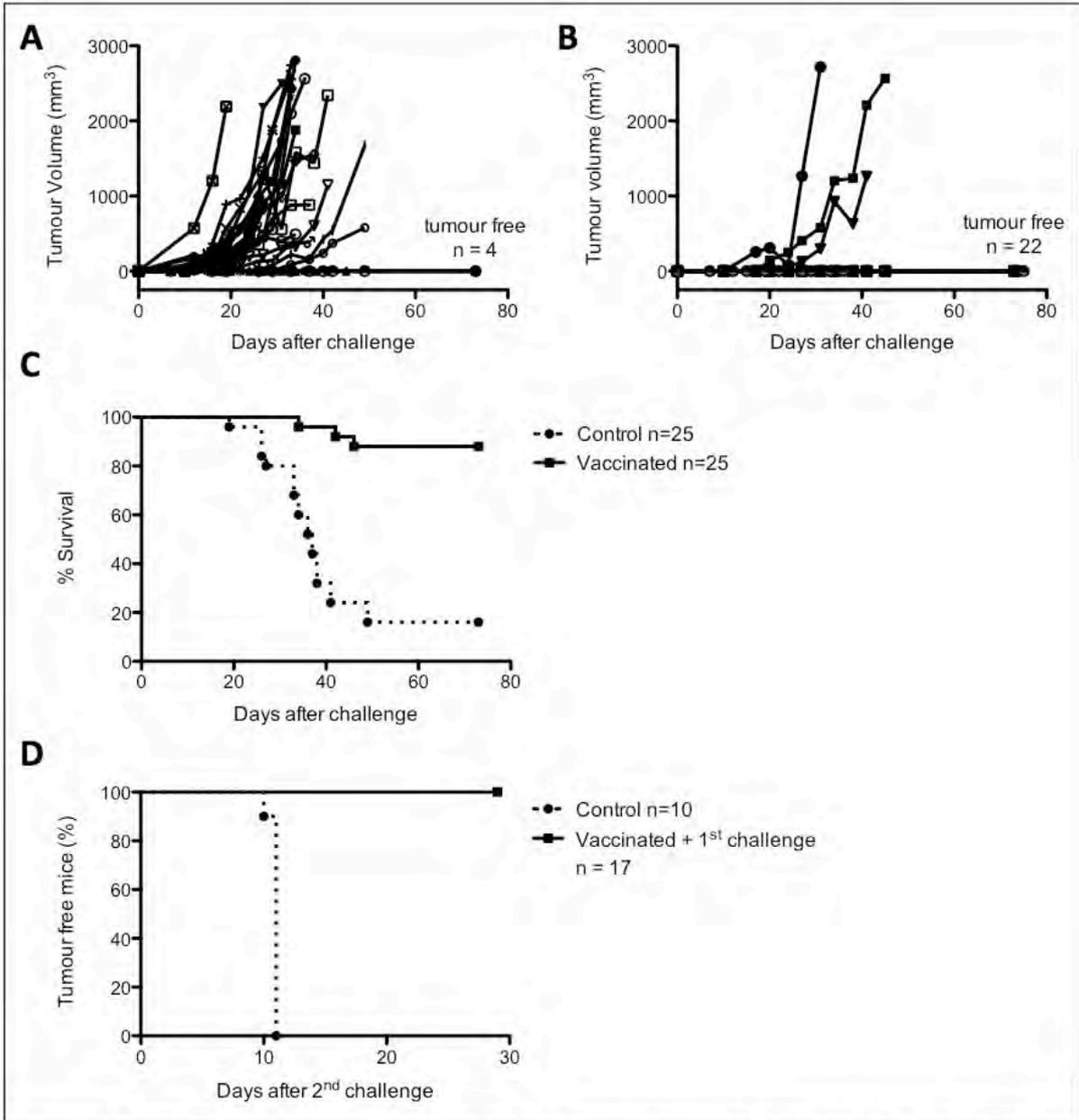
- antibodies labelled with the alpha-emitter Bismuth-213 kill CD33-positive acute myeloid leukaemia cells specifically by activation of caspases and break radio- and chemoresistance by inhibition of the anti-apoptotic proteins X-linked inhibitor of apoptosis protein and B-cell lymphoma-extra large. *European Journal of Cancer*. Elsevier Ltd; 2013;49:2542–54.
13. Supiot S, Gouard S, Charrier J, Apostolidis C, Chatal J-F, Barbet J, et al. Mechanisms of cell sensitization to alpha radioimmunotherapy by doxorubicin or paclitaxel in multiple myeloma cell lines. *Clin. Cancer Res.* 2005;11:7047s–7052s.
  14. Seidl C, Port M, Gilbertz K-P, Morgenstern A, Bruchertseifer F, Schwaiger M, et al. 213Bi-induced death of HSC45-M2 gastric cancer cells is characterized by G2 arrest and up-regulation of genes known to prevent apoptosis but induce necrosis and mitotic catastrophe. *Molecular Cancer Therapeutics.* 2007;6:2346–59.
  15. Boyd M, Ross SC, Dorrens J, Fullerton NE, Tan KW, Zalutsky MR, et al. Radiation-induced biologic bystander effect elicited in vitro by targeted radiopharmaceuticals labeled with alpha-, beta-, and auger electron-emitting radionuclides. *J. Nucl. Med.* 2006;47:1007–15.
  16. Chakravarty PK, Alfieri A, Thomas EK, Beri V, Tanaka KE, Vikram B, et al. Flt3-ligand administration after radiation therapy prolongs survival in a murine model of metastatic lung cancer. *Cancer Research.* 1999;59:6028–32.
  17. Demaria S, Ng B, Devitt ML, Babb JS, Kawashima N, Liebes L, et al. Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *Radiation Oncology Biology.* 2004;58:862–70.
  18. Golden EB, Pellicciotta I, Demaria S, Barcellos-Hoff MH, Formenti SC. The convergence of radiation and immunogenic cell death signaling pathways. *Front Oncol.* 2012;2:88.
  19. Formenti SC, Demaria S. Combining radiotherapy and Cancer Immunotherapy: a Paradigm Shift. *J Natl Cancer Inst.* 2012;;1–10.
  20. Cameron RB, Spiess PJ, Rosenberg SA. Synergistic antitumor activity of Tumor-Infiltrating Lymphocytes, Interleukin-2 and local tumor irradiation. *J. Exp. Med.* 1990;

Volume 171:249–63.

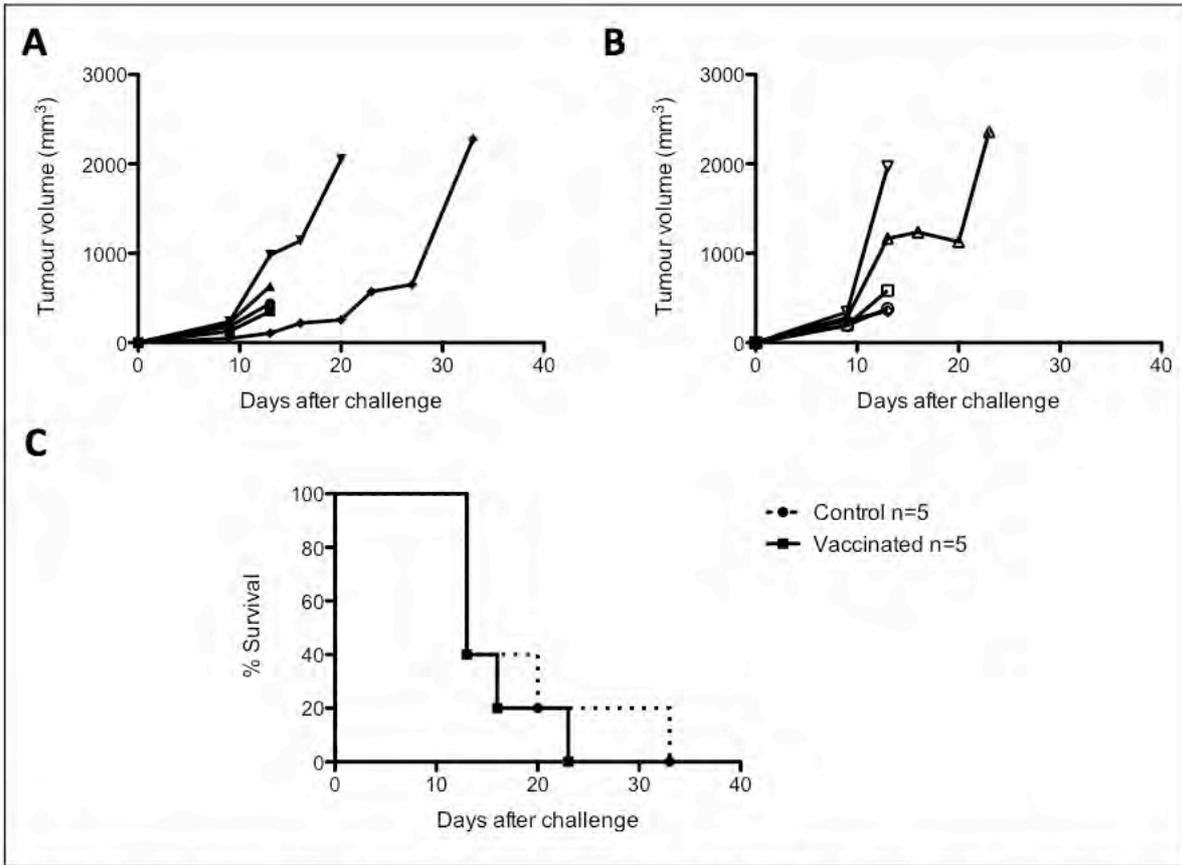
21. Chakraborty M, Gelbard A, Carrasquillo JA, Yu S, Mamede M, Paik CH, et al. Use of radiolabeled monoclonal antibody to enhance vaccine-mediated antitumor effects. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;57:1173–83.
22. Nikula TK, Curcio MJ, Brechbiel MW, Gansow OA, Finn RD, Scheinberg DA. A rapid, single vessel method for preparation of clinical grade ligand conjugated monoclonal antibodies. *Nuclear Medicine and Biology.* 1995;22:387–90.
23. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993;90:3539–43.
24. Delemarre FG, Hoogeveen PG, De Haan-Meulman M, Simons PJ, Drexhage HA. Homotypic cluster formation of dendritic cells, a close correlate of their state of maturation. Defects in the biobreeding diabetes-prone rat. *J. Leukoc. Biol.* 2001;69:373–80.
25. Matzinger P. The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science.* 2002;296:301–5.
26. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze M. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunological reviews.* John Wiley & Sons. 2012;249:1–18.
27. Nace G, Evankovich J, Eid R, Tsung A. Dendritic Cells and Damage-Associated Molecular Patterns: Endogenous Danger Signals Linking Innate and Adaptive Immunity. *J Innate Immun.* 2012;4:6–15.
28. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annu. Rev. Immunol.* 2013;31:51–72.
29. Gabilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:941–52.
30. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* 2007;81:1–5.

31. Garg AD, Nowis D, Golab J, Vandenabeele P, Krysko DV, Agostinis P. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: An emerging amalgamation. *BBA - Reviews on Cancer*. Elsevier B.V; 2010;1805:53–71.
32. Basu S, Binder R, Ramalingam T, Srivastava P. CD91 Is a Common Receptor for Heat Shock Proteins gp96, hsp90, hsp70, and Calreticulin. *Immunity*. Cell press. 2001;14:1–11.
33. Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 Is a Therapeutic Target for Sterile Inflammation and Infection. *Annu. Rev. Immunol*. 2011;29:139–62.
34. Suzuki Y, Mimura K, Yoshimoto Y, Watanabe M, Ohkubo Y, Izawa S, et al. Immunogenic Tumor Cell Death Induced by Chemoradiotherapy in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research*. 2012;72:3967–76.
35. Chung H, Lee S-G, Kim H, Hong D, Chung J, Stroncek D, et al. Serum high mobility group box-1 (HMGB1) is closely associated with the clinical and pathologic features of gastric cancer. *J Transl Med*. 2009;7:38.
36. Yang G-L, Zhang L-H, Bo J-J, Huo X-J, Chen H-G, Cao M, et al. Increased expression of HMGB1 is associated with poor prognosis in human bladder cancer. *J. Surg. Oncol*. 2012;106:57–61.
37. Riuzzi F, Sorci G, Donato R. The amphoterin (HMGB1)/receptor for advanced glycation end products (RAGE) pair modulates myoblast proliferation, apoptosis, adhesiveness, migration, and invasiveness. Functional inactivation of RAGE in L6 myoblasts results in tumor formation in vivo. *J. Biol. Chem*. 2006;281:8242–53.
38. Kuniyasu H, Oue N, Wakikawa A, Shigeishi H, Matsutani N, Kuraoka K, et al. Expression of receptors for advanced glycation end-products (RAGE) is closely associated with the invasive and metastatic activity of gastric cancer. *J. Pathol*. 2002;196:163–70.
39. Sasahira T, Akama Y, Fujii K, Kuniyasu H. Expression of receptor for advanced glycation end products and HMGB1/amphoterin in colorectal adenomas. *Virchows Arch*. 2005;446:411–5.

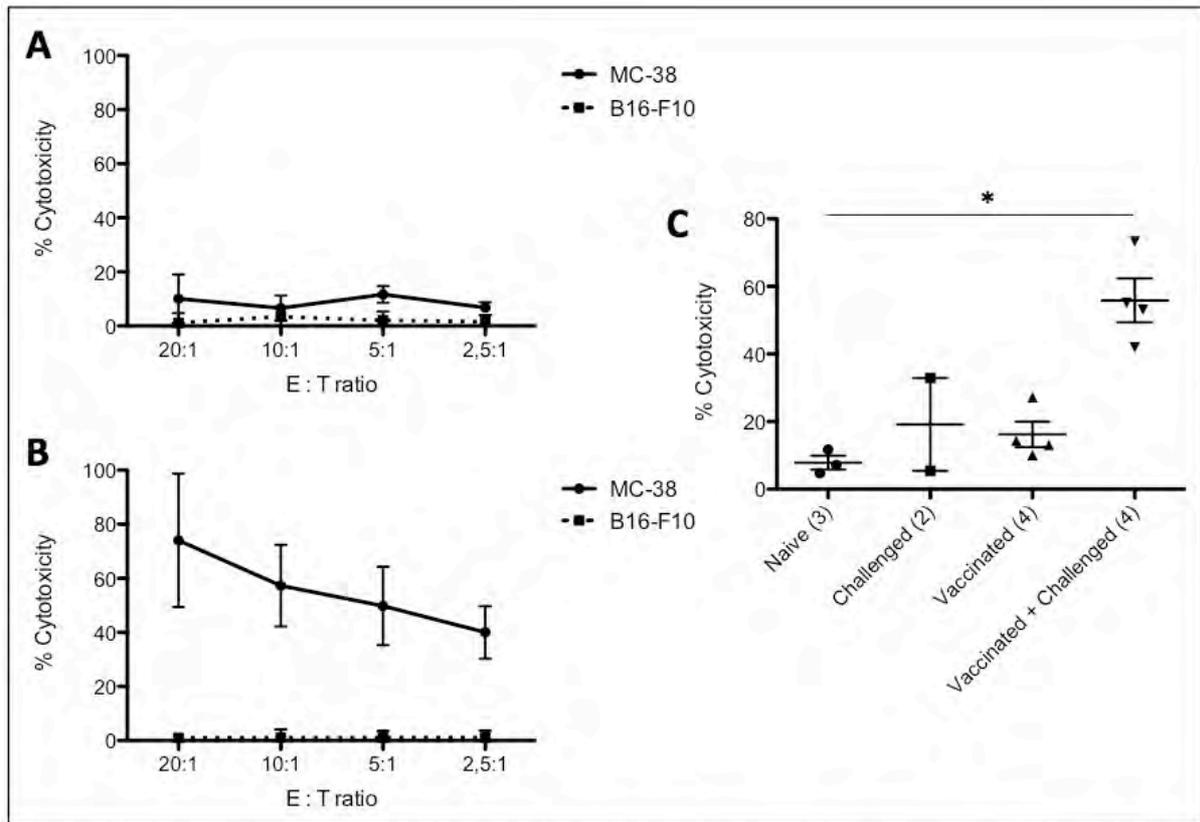
40. Beijnum JR, Buurman WA, Griffioen AW. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis*. 2008;11:91–9.
41. Campana L, Bosurgi L, Rovere-Querini P. HMGB1: a two-headed signal regulating tumor progression and immunity. *Current Opinion in Immunology*. 2008;20:518–23.
42. Venereau E, Casalgrandi M, Schiraldi M, Antoine DJ, Cattaneo A, De Marchis F, et al. Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *Journal of Experimental Medicine*. 2012;209:1519–28.
43. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*. 2007;13:1050–9.



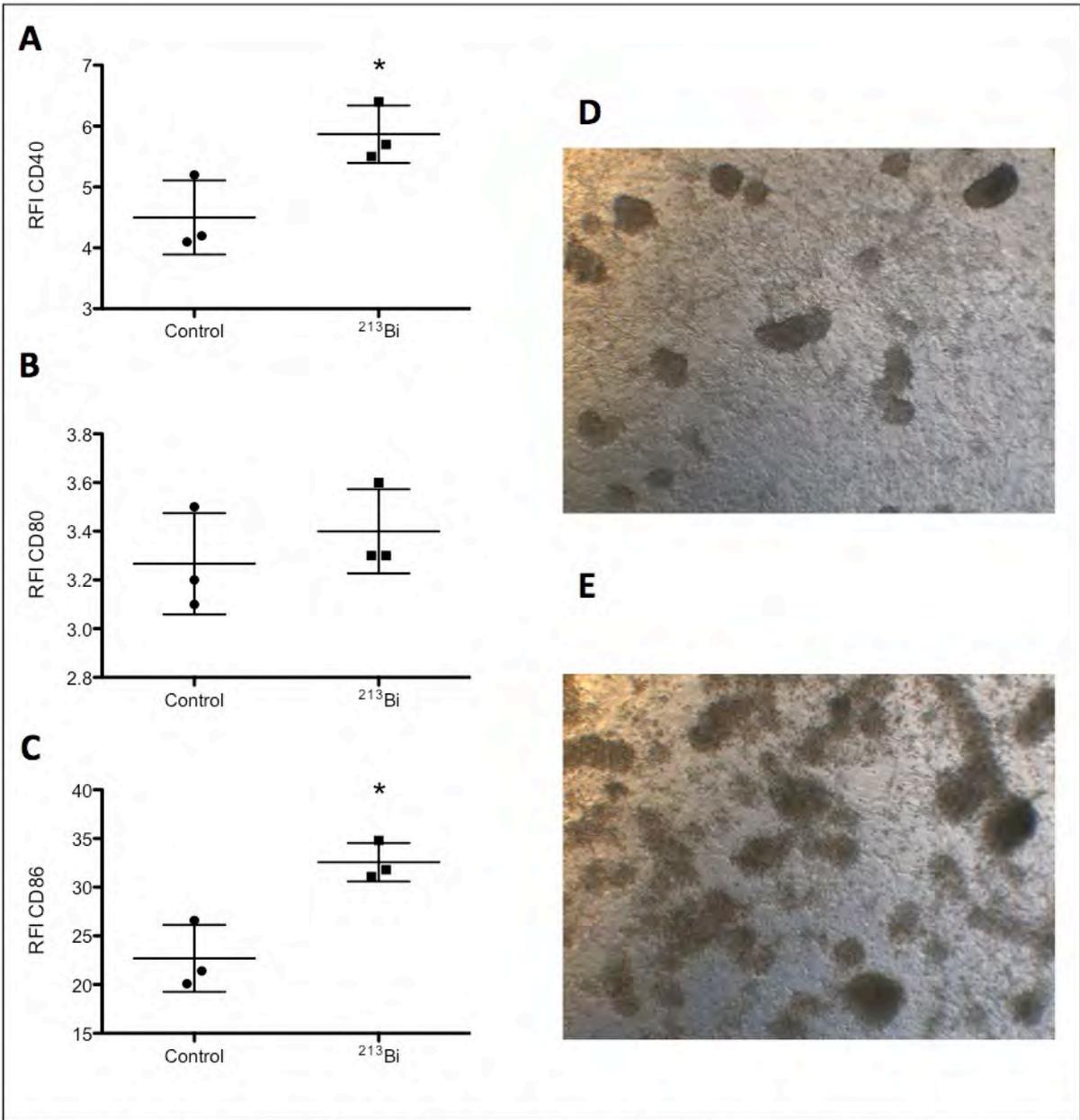
**Figure 1. Tumor cells irradiated with <sup>213</sup>Bi give rise to anti-tumor protection *in vivo*.** *A and B*, Tumour volume progression for control (*A*) and immunized mice (*B*) after MC-38 engraftment. Volume were calculated as (length  $\times$  width  $\times$  height  $\times$   $\pi$ )/6. *C*, Kaplan-Meier analysis of mice immunized with <sup>213</sup>Bi-treated cells (square) versus control C57Bl/6 (circles) after subcutaneous challenge with  $2 \times 10^5$  live MC-38. Median survival was 37 days for controls and was not reached for the immunized group. P value determined by the log-rank test was extremely significant ( $p < 0.0001$ ). *D*, Tumor free fraction of mice after a second challenge with live MC38.  $p < 0.0001$ .



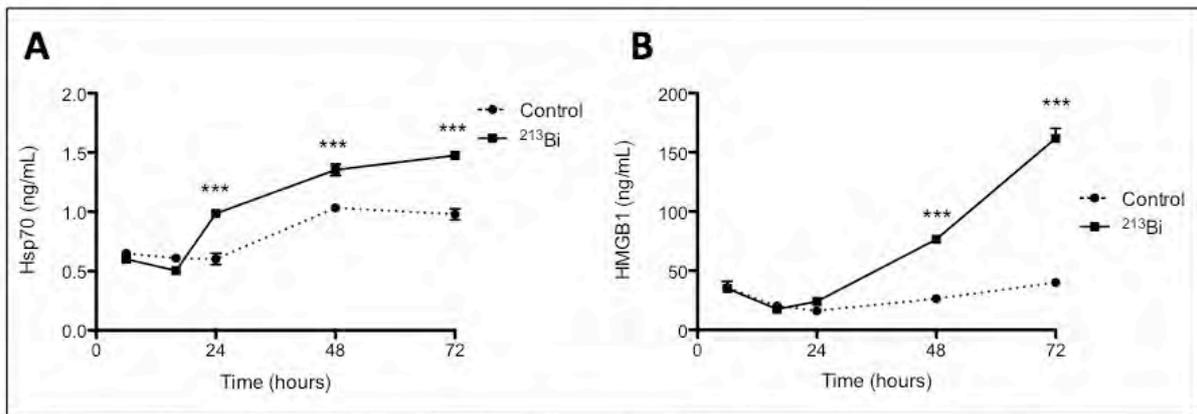
**Figure 2. Immunization with  $\alpha$ -irradiated MC38 fails in nude mice.** *A and B*, Tumour volume progression for control (*A*) and immunized nude mice (*B*) after MC38 engraftment. *C*, Kaplan-Meier analysis of mice immunized with  $^{213}\text{Bi}$ -treated cells (square) versus control nude mice (circles) after subcutaneous challenge with  $2 \times 10^5$  live MC-38. Median survival was 13 days for both the control and immunized group.  $P = 0.5716$ .



**Figure 3. Anti-tumor response is dependent on cytotoxic T cells.** *A and B*,  $^{51}\text{Cr}$  release assay against MC-38 or the irrelevant cell line B16-F10 were performed on T cells purified from naïve mice (*A*) or mice that had been immunized with  $^{213}\text{Bi}$ -treated MC-38 and subsequently challenged with live MC-38 (*B*). Assays were performed at different effector to target ratio (E : T), data points represent mean  $\pm$  SD of triplicate measurements for 3 naïve mice (*A*) and 4 vaccinated + challenged mice (*B*). *C*, Scatter plot of mean percentage of T cell cytotoxicity against MC-38 at the E:T ratio of 10:1 for different group of mice. In brackets (number of mice in each group).  $P < 0.05$  between naïve mice and mice that have been immunized and challenged. P value was determined by non parametric Mann Whitney test. Mean cytotoxicity was 7.87% for naïve mice, 19.15% for challenged mice, 16,2% for vaccinated mice and 55,85% for vaccinated + challenged mice.



**Figure 4.**  $^{213}\text{Bi}$  irradiated MC-38 elicit DC maturation. *A, B and C*, Triplicate analysis of Ratio of Fluorescence Intensity (RFI) for CD40 (A), CD80 (B) and CD86 (C). RFI are calculated as geometric mean of fluorescence intensity of the specific antibody divided by that of the control isotype. *D and E*, Snapshot of BMDC after 24 hours in culture with  $5 \times 10^6$  control MC38 (D) or  $5 \times 10^6$  irradiated MC-38 (E). \*  $p < 0.05$  determined using Mann Whitney non parametric test.

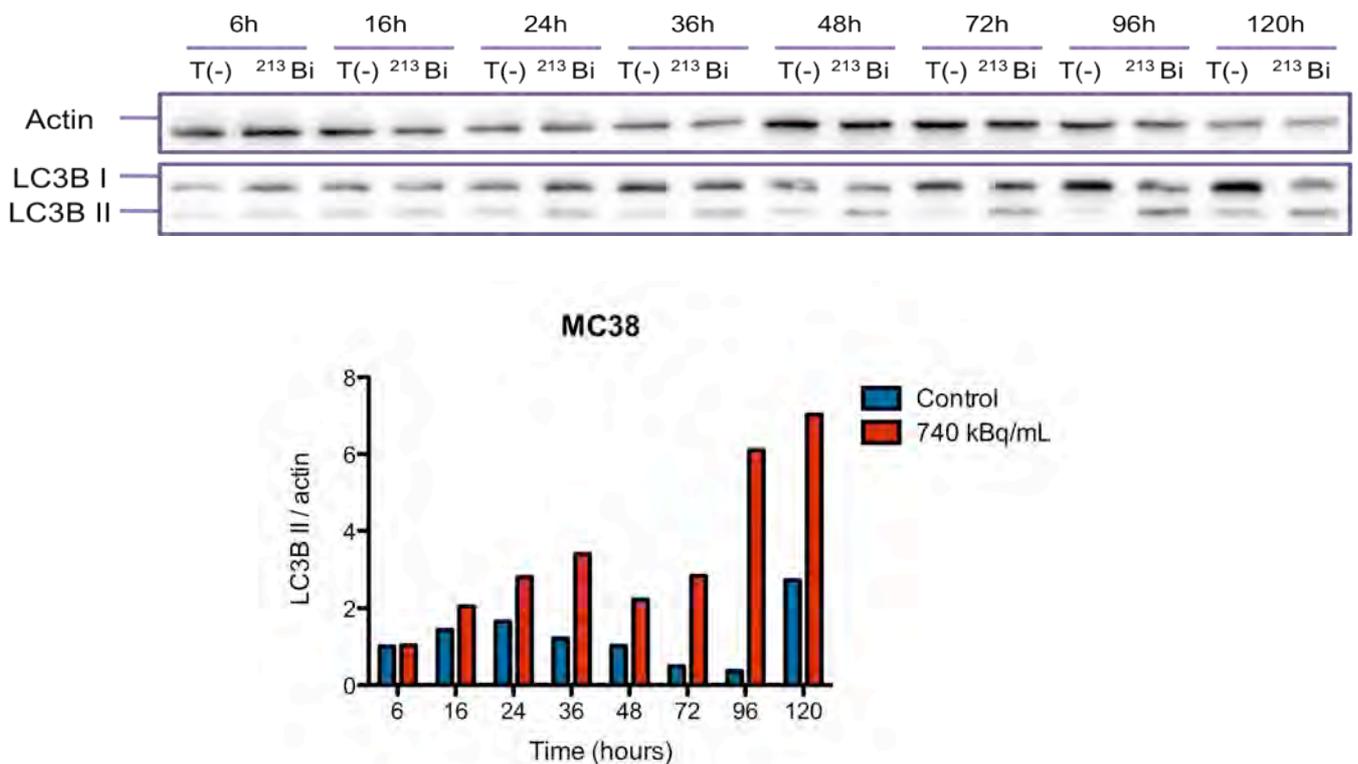


**Figure 5. DAMPs release after irradiation.** *A and B*, Evolution of Hsp70 (A) and HMGB1 (B) concentrations determined by ELISA on MC-38 conditioned media after irradiation with <sup>213</sup>Bi (squares) and on controls (circles). Data points represent mean ± SD of triplicate measurements. \*\*\* p<0.001 as determined by two-way ANOVA and Bonferonni post-tests. Results are representative of 2 independent experiments.

## 2.2. Données supplémentaires

### 2.2.1. Effet du $^{213}\text{Bi}$ sur l'immunogénicité de MC-38

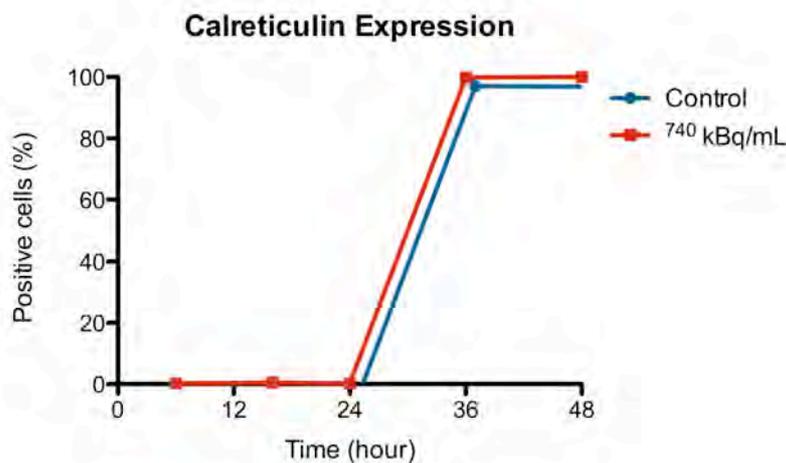
Des études récentes ont montré que l'autophagie était nécessaire à l'induction d'une mort cellulaire immunogène, nous avons donc suivi l'évolution de l'autophagie après irradiation au  $^{213}\text{Bi}$  par western blot dirigé contre la protéine LC3B. Nous avons observé une forte augmentation de la forme LC3B-II après irradiation, démontrant l'augmentation de la quantité d'autophagosomes et indiquant donc une augmentation de l'autophagie en réponse à l'irradiation  $\alpha$  (Figure 38).



**Figure 38 : Augmentation de la quantité de LC3B-II après irradiation au  $^{213}\text{Bi}$**

Western blot pour la protéine LC3B après irradiation MC-38 au  $^{213}\text{Bi}$ . Les blots pour la protéine actine ont été réalisés en contrôle. En bas, La quantification densimétrique du signal LC3B-II normalisée par rapport à l'actine à été réalisé grâce au logiciel Bio-1D.

Parmi les autres molécules impliquées dans la mort cellulaire immunogène, la calréticuline est l'une des plus importante. La translocation de la calréticuline à la surface des cellules est causée par un stress du réticulum endoplasmique et est reconnue par les cellules du système immunitaire comme un signal de phagocytose. La calréticuline permet donc la prise en charge des cellules par le système immunitaire. Cependant, à l'inverse d'autres signaux de phagocytose tels que la phosphatidylsérine qui conduisent à la suppression de la réponse immunitaire, la calréticuline permet la crossprésentation des antigènes associés aux cellules phagocytées qui conduit à l'activation des cellules de l'immunité. Nous avons observé une augmentation de l'expression membranaire de calréticuline à la surface des cellules MC-38 après l'irradiation par le  $^{213}\text{Bi}$  (Figure 39). Cependant cette augmentation s'est également produite sur les témoins non irradiés. Une explication possible provient du fait que les témoins non irradiés continuent de proliférer tout au long du suivi, lors de cette expérience nous n'avons pas procédé au réensemencement des cellules lorsqu'elles arrivait à confluence. Il est donc possible que la trop grande densité cellulaire des cellules non irradiées ait induit un stress suffisant à la translocation de la calréticuline. Il sera donc nécessaire de réitérer cette expérience dans des conditions où les témoins n'arrivent pas à confluence.

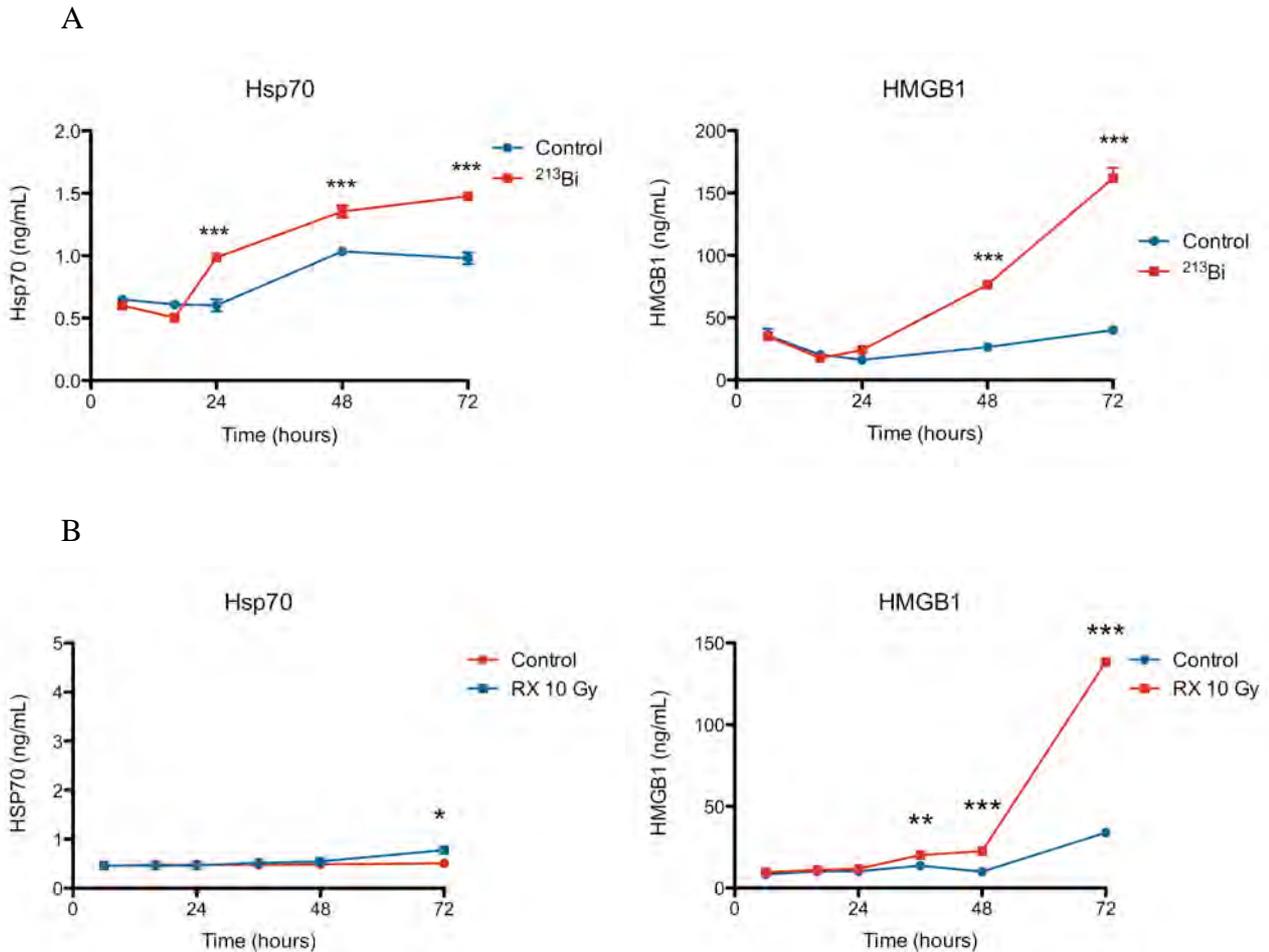


**Figure 39 : Suivi de l'expression de calréticuline à la surface des cellules après irradiation au  $^{213}\text{Bi}$**

L'analyse de l'expression membranaire de calréticuline a été réalisée par cytométrie de flux. Les données présentées représentent une seule expérience.

### 2.2.2. Comparaison avec l'irradiation par rayon X

En contrôle et pour comparaison avec l'irradiation  $\alpha$ , nous avons étudié la réponse des cellules MC-38 aux rayons X. Comme pour le  $^{213}\text{Bi}$ , nous avons observé une libération de HMGB1 par les cellules irradiées, en revanche, aucune augmentation de Hsp 70 dans le surnageant des cellules irradiées n'a été observée (Figure 40).

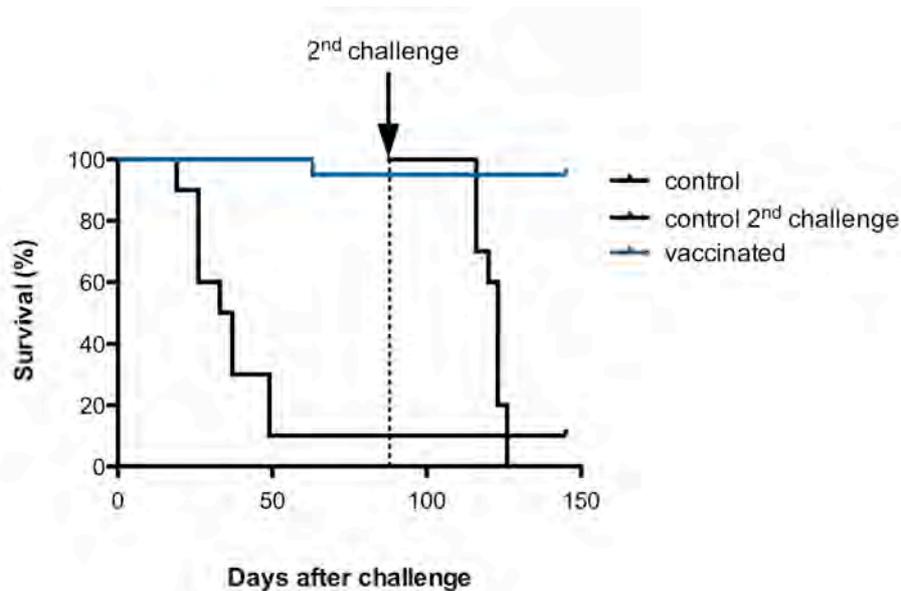


**Figure 40 : Suivi de la libération de DAMPs après irradiation aux rayons X**

A, Suivi de l'évolution de la concentration de Hsp 70 et HMGB1 dans le surnageant de culture de MC-38 après une irradiation aux bismuth-213. Les données représentent la moyenne de 3 mesures et les barres d'erreurs représentent l'écart type. B, Suivi de l'évolution de la concentration de Hsp 70 et HMGB1 dans le surnageant de culture de MC-38 après une irradiation aux rayons X de 10 Gy. Les données représentent la moyenne de 2 mesures et les barres d'erreurs représentent l'écart type. \*  $p < 0,05$  ; \*\*\*  $p < 0,001$

Nous avons également reproduit l'expérience de vaccination avec des cellules MC-38 irradiées aux rayons X. Comme avec le  $^{213}\text{Bi}$ , la vaccination par les cellules irradiées a permis

une protection anti-tumorale contre la greffe de cellules MC-38 vivantes (Figure 41). La protection établie est de longue durée puisqu'un second challenge plus de 2 mois après la vaccination n'entraîne aucune pousse tumorale. Ces résultats rejoignent l'étude de Apetoh *et al.* qui montre que les rayons X peuvent induire une mort cellulaire immunogène (Apetoh, Ghiringhelli, Tesniere, Obeid, et al. 2007b)



**Figure 41 : La vaccination par des cellules irradiées aux rayons X induit une protection anti-tumorale de longue durée**

Analyse de la survie par la méthode de Kaplan-Meier.  $P < 0,0001$  d'après le test log-rank.

## Discussion

Dans la première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à la radiobiologie de l'émetteur de particules  $\alpha$   $^{213}\text{Bi}$  sur des cellules de MM. Nous avons montré que le  $^{213}\text{Bi}$  entraîne un blocage du cycle cellulaire en phase G2, une augmentation de la quantité de protéine LC3B-II – indiquant une augmentation de l'autophagie – et une mort cellulaire tardive, plusieurs jours après l'irradiation. Les mécanismes menant à la mort des cellules irradiées semblent impliquer l'apoptose et la nécrose et pourraient également être liés à l'induction de l'autophagie.

Il est connu que les radiations ionisantes peuvent induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et G2 (Teyssier et al. 1999). Cependant l'arrêt en G1 est dépendant de la protéine p53 et donc plus rare dans le cas de cellules tumorales. Une étude a montrée que les  $\alpha$  également pouvait induire un arrêt en G1 chez des cellules présentant une p53 fonctionnelle (Gadbois et al. 1996). L'absence d'un tel effet ici indique un défaut de la protéine p53 pour les 2 lignées étudiées. La lignée LP-1 possède en effet une mutation non synonyme du gène codant la p53 (Forbes et al. 2006) et présente également un profil de méthylation important au niveau de ce gène (Hurt et al. 2006). Pour la lignée 5T33 en revanche, aucune étude n'a, à notre connaissance, démontré une déficience de l'activité p53. Le blocage du cycle cellulaire à l'interface G2/M est donc plus courant chez les cellules tumorales. Ce blocage dans la phase la plus radiosensible du cycle cellulaire permet de sensibiliser les cellules à une seconde irradiation. C'est d'ailleurs l'une des raisons pour lesquelles la plupart des traitements en radiothérapie sont réalisés en plusieurs fractions. Si l'efficacité des  $\alpha$  est moins sensible que celle des rayons X ou gamma à la distribution dans le cycle cellulaire, elle n'en est pas complètement indépendante. En effet, notre équipe a déjà montré que l'effet du  $^{213}\text{Bi}$  sur la survie clonale de différentes lignées de MM humaines était potentialisée par un prétraitement avec des chimiothérapies induisant un arrêt du cycle cellulaire en G2 (Supiot 2005). Ces résultats suggèrent que l'injection de doses répétées de  $^{213}\text{Bi}$  à une journée d'intervalle pourrait potentialiser l'effet de la RIT  $\alpha$ . Alternativement la combinaison de chimiothérapies induisant l'arrêt du cycle en G2 pourrait agir en synergie avec la RIT.

Curieusement, nous n'avons pas détecté de cassures double brin précédant l'arrêt du cycle cellulaire de la lignée LP-1, au contraire les cassures apparaissent très tardivement et semblent donc plutôt liées à l'induction de la mort cellulaire. La méthode du western blot n'est cependant pas la plus résolutive et il est possible que les cassures double brins antérieures à

l'arrêt du cycle soient trop peu nombreuses pour être détectées de cette manière. Toutefois, une autre étude réalisée par notre équipe utilisant le test des comètes n'a pas non plus détecté de cassures double brin après une irradiation au  $^{213}\text{Bi}$  de cette même lignée LP-1 (Supiot 2005). Ce test est beaucoup plus résolutif et permet la détection des cassures double brin à l'échelle d'une seule cellule. L'absence de telles lésions ne semble cependant pas spécifique des  $\alpha$  mais plutôt de la lignée étudiée puisque le  $^{213}\text{Bi}$  provoque des cassures double brin dans une autre lignée de MM (RPMI 8266). Il serait donc intéressant d'étudier plus en détails les mécanismes précoces de la réponse à l'irradiation au  $^{213}\text{Bi}$  afin de déterminer les événements qui conduisent à l'arrêt du cycle cellulaire dans la lignée LP-1.

Nous avons ensuite cherché à identifier les mécanismes de mort cellulaire résultants de l'irradiation par le  $^{213}\text{Bi}$ . L'association de l'Annexine V avec un colorant vital a montré des niveaux d'apoptose très faibles et une perméabilisation de la majorité des cellules aux colorant vital suggérant ainsi que la mortalité cellulaire s'effectue préférentiellement par nécrose. L'absence de forte fragmentation de l'ADN génomique révélée par électrophorèse semble également confirmer ces résultats. Ces résultats sont également en accord avec l'étude de Supiot *et al.* qui ne montre pas d'augmentation de l'antigène apo 2.7 après irradiation par le  $^{213}\text{Bi}$  pour la lignée LP-1. Toutefois, cette étude montre une induction d'apoptose pour d'autres lignées de MM humaines (Supiot 2005). De plus, nous avons observé une augmentation de l'activation de la caspase-3 pour la lignée 5T33 et LP-1, indiquant qu'une proportion significative des cellules subit une mort par apoptose. Il sera donc nécessaire de réaliser des analyses complémentaires pour connaître la part de l'apoptose dans la mortalité cellulaire induite par les émetteurs de particules  $\alpha$ . Nous envisageons un suivi en microscopie time-lapse des cellules irradiées avec différents marqueurs de l'apoptose et de la nécrose et des analyses en présence ou non d'inhibiteurs des caspases pour documenter plus précisément ces mécanismes. La réalisation de western blots dirigés contre les protéines impliquées dans la signalisation de l'apoptose, telles que Bax, Bcl-2 et Bcl-xL, est également en cours.

Nous avons suivi la mortalité cellulaire jusqu'à 5 jours après l'irradiation, cependant, nous avons constaté que la mortalité observée ne dépasse pas 45% des cellules irradiées alors que les tests de clonogénicité ont montré que plus de 85% des cellules irradiées ne survivent pas sur le long terme. Il est donc possible que certains mécanismes de mort soient mis en place plus tardivement, la catastrophe mitotique, par exemple, peut survenir après plusieurs divisions cellulaires. Alternativement, certaines cellules peuvent entrer en sénescence et ne jamais former de colonies. Ces deux phénomènes ont en effet été très largement décrits dans

la réponse aux rayons X et gamma (Okada & Mak 2004; Vakifahmetoglu et al. 2008; d'Adda di Fagagna 2008).

Nous avons également montré une augmentation de la quantité de la forme clivée et conjuguée de la protéine LC3B (forme LC3B-II) après irradiation au  $^{213}\text{Bi}$ . La protéine LC3B-II est recrutée à la membrane des vésicules autophagiques lors de leur formation et sa quantité est donc corrélée à la quantité d'autophagosomes. Nos résultats indiquent donc une augmentation du nombre d'autophagosomes dans les cellules irradiées (5T33, LP-1 et MC38) et suggèrent que l'irradiation par les particules  $\alpha$  stimule le processus autophagique à l'instar des rayons X/gamma et des neutrons (Altmeyer et al. 2011). Cependant, 2 phénomènes peuvent conduire à l'augmentation du nombre d'autophagosomes dans une cellule : une augmentation de la formation des vésicules autophagiques ou une diminution de leur dégradation. Pour faire la distinction entre ces 2 phénomènes opposés, il est nécessaire d'étudier le flux autophagique en présence d'inhibiteurs de la dégradation des autophagosomes. Si l'effet observé sur l'autophagie est augmenté en présence de tels inhibiteurs, cela indique que la dégradation des autophagosomes fonctionnait et que l'augmentation de LC3B-II résulte bien d'une activation de l'autophagie. À l'inverse, si l'ajout des inhibiteurs ne change rien, c'est que la dégradation était déjà bloquée et que l'effet observé est en réalité dû à un blocage de cette phase finale de l'autophagie. Les expériences que nous avons réalisées avec la Bafilomycine A1, un inhibiteur de la fusion des autophagosomes avec les lysosomes, ont montré un effet additif de l'irradiation au  $^{213}\text{Bi}$  et de la Bafilomycine sur la prolifération cellulaires des cellules tumorales 5T33 et LP-1. Ceci indique donc que la dégradation des autophagosomes n'est pas bloquée par l'irradiation au  $^{213}\text{Bi}$  et que ce serait bien l'autophagie qui est stimulée. De plus, l'irradiation au  $^{213}\text{Bi}$  en présence de bortézomib, un inhibiteur du protéasome qui entraîne l'activation de l'autophagie dans les cellules de myélome (Hoang et al. 2009), ne présente pas d'effet additionnel par rapport à l'irradiation seule, suggérant également que l'autophagie est déjà activée par l'action du  $^{213}\text{Bi}$  (données non présentées). Il sera cependant nécessaire de confirmer ces résultats par des techniques permettant de suivre la quantité d'autophagosomes en présence ou non de modulateurs de l'autophagie.

Le rôle de l'autophagie dans la réponse à l'irradiation est encore controversé. Dans certains cas, l'autophagie peut contribuer à la radiorésistance (Lomonaco et al. 2009; Chaachouay et al. 2011) alors que dans d'autres cas elle permet la radiosensibilisations des cellules tumorales (K. W. Kim et al. 2009; Chang et al. 2012). L'implication de l'autophagie dans la mortalité

cellulaire est également débattue puisque certains considèrent ce processus comme un mécanisme de mort cellulaire programmée (Gozuacik & Kimchi 2004; Tsujimoto & Shimizu 2005) et d'autres considèrent qu'il s'agit plutôt d'un mécanisme de réponse au stress qui, en cas d'activation excessive, peut conduire à la mort cellulaire (Kroemer et al. 2008; Galluzzi et al. 2011). Dans notre étude, l'inhibition de l'autophagie par la 3-MA protège les cellules LP-1 de l'arrêt de prolifération provoquée par l'irradiation au  $^{213}\text{Bi}$ . Ceci indique que l'autophagie pourrait participer à la sensibilisation de ces cellules tumorales à l'irradiation et participe peut-être à l'induction de la mortalité. Il a par ailleurs été montré pour d'autres lignées humaines de myélome multiple que l'autophagie excessive conduisait à la mort de ces cellules (Hoang et al. 2009; Michallet et al. 2011). Cependant, les tests clonogéniques que nous avons réalisés en présence ou non d'inhibiteurs de l'autophagie n'ont pas montré de différence sur la survie clonale liées à la modulation de l'autophagie. Ceci suggère que l'autophagie joue un rôle dans l'arrêt initial de prolifération mais ne cause pas la mort des cellules irradiées. Il faut toutefois rester très prudent quant à l'interprétation de ces résultats, nous n'avons en effet pas confirmé que l'autophagie était effectivement inhibée sur toute la durée du test clonogénique et, bien que la 3-MA soit l'inhibiteur de l'autophagie le plus utilisé, une étude a récemment montré que son utilisation prolongée dans des conditions riches en nutriment pouvait au contraire activer l'autophagie (Wu et al. 2010). Il sera donc nécessaire de réitérer ces expériences en contrôlant le niveau d'autophagie par un suivi de la formation des autophagosomes ou en utilisant d'autres systèmes d'inhibition tels que des siRNA dirigés contre diverses protéines impliquées dans le processus autophagique. Il sera également intéressant d'étudier en détail les liens entre l'autophagie et d'autres mécanismes de mort cellulaire, les voies de signalisation menant à l'autophagie ou à l'apoptose semblent en effet très liées (Kang et al. 2011; Pattingre et al. 2005).

L'induction de l'autophagie peut également s'avérer très importante pour le développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale. Il a en effet été montré que l'autophagie serait nécessaire pour l'immunogénicité de la mort cellulaire induite par certaines chimiothérapies (Michaud et al. 2011). Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'autophagie était requise pour la libération d'ATP par les cellules tumorales, et que l'ATP extracellulaire permettait le recrutement de cellules de l'immunité. Il a aussi été montré que l'autophagie au sein des cellules phagocytées par les DC rend la cross-présentation des antigènes aux lymphocytes T plus efficace (Uhl et al. 2009).

L'induction ou le rétablissement d'une réponse immunitaire anti-tumorale efficace peut s'avérer très importante dans le traitement du cancer. Il a été montré dans de multiples études précliniques et cliniques qu'une réponse immunitaire anti-tumorale était associée à un meilleur pronostic. Nous nous sommes donc intéressés à la libération de DAMPs après l'irradiation par le  $^{213}\text{Bi}$ , ces molécules normalement exprimées intracellulairement peuvent induire le recrutement et l'activation de cellules de l'immunité lorsqu'elles sont libérées dans le milieu extracellulaire en réponse à un stress ou une mort cellulaire non physiologique (Garg et al. 2010; Tang et al. 2012). Nous avons observé la libération de Hsp70 et HMGB1 par la lignée MC38 après irradiation par le  $^{213}\text{Bi}$ . La cinétique de libération de ces molécules correspond avec l'induction de la mort cellulaire et suggère donc plutôt un relargage passif lors d'une nécrose (primaire ou secondaire) qu'une sécrétion active de ces molécules. L'irradiation par des particules  $\alpha$  semble donc susceptible d'induire un signal danger qui pourrait permettre la mise en place d'une réponse immunitaire. Toutefois, la présence de taux élevés de HMGB1 dans le sérum des patients peut être associée à un mauvais pronostic (Chung et al. 2009; G.-L. Yang et al. 2012) et la surexpression de HMGB1 est une caractéristique commune à de nombreux cancers. HMGB1 peut en effet promouvoir l'invasion tumorale et la formation de métastases (Kuniyasu et al. 2002; Sasahira et al. 2005) ainsi que la formation de néovaisseaux nécessaire à la progression tumorale (Beijnum et al. 2008). Une inflammation chronique liée à une surexpression de HMGB1 peut également participer à la progression tumorale (Campana et al. 2008). Il est cependant probable qu'une augmentation rapide et locale de HMGB1 liée à une forte mortalité cellulaire produise un effet différent sur le système immunitaire qu'une sécrétion chronique et systémique. Certaines études ont d'ailleurs démontré que la sécrétion de HMGB1 en réponse à des chimiothérapies ou à la radiothérapie était nécessaire à l'activation de la réponse immunitaire anti-tumorale (Apetoh, Ghiringhelli, Tesniere, Criollo, et al. 2007a).

Afin de déterminer l'effet de la libération de DAMPs par les cellules irradiées au  $^{213}\text{Bi}$  sur la réponse immunitaire, nous avons mis en contact des cellules dendritiques avec les surnageants conditionnés de cellules MC-38 irradiées. Nous avons pu montrer que ces surnageants induisent l'augmentation de l'expression de différentes molécules de costimulation sur les DC ainsi que des changements morphologiques caractéristiques d'une activation de ces cellules. Des résultats similaires ont été obtenus après irradiation des lignées de myélome multiple 5T33 et LP-1 par le  $^{213}\text{Bi}$  (données non présentées). Ces résultats indiquent donc que l'irradiation par le  $^{213}\text{Bi}$  permet l'activation des DC *in vitro*. Le rôle des DC est primordial

dans l'activation d'une réponse immunitaire anti-tumorale, elles sont en effet capables de crossprésenter des antigènes de tumeurs aux lymphocytes T et de fournir les signaux nécessaires à leur activation (costimulation et cytokines stimulatrices).

Nous avons ensuite réalisé des expériences de vaccination anti-tumorale chez la souris à l'aide de cellules irradiées par le  $^{213}\text{Bi}$  afin de déterminer si l'irradiation par des particules  $\alpha$  permettait l'induction d'une réponse immunitaire *in vivo*. La vaccination par des MC-38 traitées au  $^{213}\text{Bi}$  a effectivement conduit à la protection des souris contre un challenge tumoral avec des cellules MC-38 vivantes. Ces résultats confirment que le  $^{213}\text{Bi}$  entraîne une mort cellulaire immunogène capable de mener à une réponse immunitaire anti-tumorale efficace *in vivo*. Il serait intéressant de réitérer ces expériences en inhibant l'autophagie ou la sécrétion de HMGB1 pour déterminer l'importance de ces phénomènes dans l'induction de la réponse anti-tumorale.

La protection induite par la vaccination est de longue durée puisqu'un challenge tumoral plus de 2 mois après la vaccination n'induit pas la pousse de tumeur. Ceci indique que la réponse anti-tumorale est dépendante de l'immunité adaptative et que la vaccination par les cellules irradiées permet la mise en place d'une mémoire immunitaire. La vaccination de souris déficientes en lymphocytes T ne permet pas l'induction d'une protection anti-tumorale, les lymphocytes T sont donc nécessaires à la réponse anti-tumorale observée. Des tests de cytotoxicité ont permis de confirmer la présence de lymphocytes T spécifique de MC-38 chez les souris immunocompétentes après vaccination et injection de MC-38 vivantes. Pour confirmer la spécificité de la réponse anti-tumorale induite, il serait intéressant de voir si la pousse d'une autre lignée tumorale est inhibée après vaccination par les MC-38 irradiées au  $^{213}\text{Bi}$ . L'implication des lymphocytes T n'exclue pas le rôle d'autres cellules de l'immunité, il peut donc être envisagé de réaliser les expériences de vaccination sur des souris dépourvues de cellules NK ou de lymphocytes B.

La réponse anti-tumorale induite ici permet le rejet d'une greffe de cellules tumorales vivantes, cependant, ceci ne correspond pas à la réalité clinique dans laquelle on ne peut intervenir que sur des tumeurs déjà préexistantes. Il sera donc nécessaire d'effectuer des expériences de vaccination avec des cellules irradiées par des particules  $\alpha$  sur des souris déjà porteuses d'une tumeur établie. En effet, la préexistence d'une tumeur établie peut affecter le système immunitaire, notamment par la mise en place de cellules suppressives de l'immunité conduisant à une tolérance vis à vis de la tumeur. Il est donc important de déterminer si la

mort cellulaire induite par les particules  $\alpha$  permet la mise en place d'une réponse anti-tumorale dans un tel contexte. Il sera également intéressant de développer un modèle préclinique dans lequel la tumeur sera irradiée *in vivo* par la RIT en transfectant la lignée MC-38 par un antigène que nous puissions cibler à l'aide d'un anticorps spécifique.

L'environnement immunosuppresseur observé chez les patients cancéreux est l'une des raisons pour lesquelles l'effet abscopal induit par la radiothérapie est si rarement observé en clinique (Formenti & Demaria 2012). Toutefois, de récents essais cliniques ont montré qu'il est possible d'augmenter significativement la probabilité d'un effet abscopal grâce à des traitements combinant la radiothérapie à l'immunothérapie. Tester des combinaisons thérapeutiques alliant RIT  $\alpha$  et diverses immunothérapies apparaît donc une voie à investiguer. Au niveau préclinique, notre équipe a montré la synergie de la RIT  $\alpha$  utilisant le  $^{213}\text{Bi}$  dans un modèle de MM (5T33) en combinaison avec l'injection de Flt3-L – une molécule stimulant la production de DC – ou en association avec le transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques de la tumeur (données non publiées). Le système immunitaire peut donc jouer un rôle important dans l'effet anti-tumoral de la radiothérapie par les particules  $\alpha$  et de la radiothérapie en général. Beaucoup de traitements ne sont testés que sur des animaux immunodéficients en préclinique négligeant totalement l'effet sur la réponse immunitaire, à l'avenir il sera donc important d'inclure des tests sur des animaux possédant un système immunitaire fonctionnel.

Cependant, de nombreux traitements utilisés en clinique dans le traitement du cancer provoquent une immunosuppression importante. C'est le cas par exemple du melphalan, un agent alkylant utilisé dans le traitement du MM, qui entraîne une destruction des cellules de la moelle osseuse (Bayraktar et al. 2013). La pertinence de stratégies reposant sur l'induction d'une réponse immunitaire peut donc être questionnée dans le cas de patients présentant un système immunitaire très affaibli. Une étude de notre équipe a testé la combinaison de la RIT  $\alpha$  et du melphalan dans un modèle préclinique de MM. Cette étude n'a montré aucun effet additif des 2 traitements par rapport à chaque traitement seul (article soumis).

En résumé, nous avons montré dans cette étude que l'irradiation par des émetteurs de particules  $\alpha$ , en l'occurrence le  $^{213}\text{Bi}$ , permet l'induction d'une mort cellulaire immunogène capable d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale dépendante de l'immunité adaptative *in vivo*. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans le traitement des

cancers pour le développement de thérapies combinées utilisant la RIT  $\alpha$  couplée à l'immunothérapie.

## Bibliographie

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/>

<http://www.euro.who.int/en/what-we-do/data-and-evidence/european-health-report-2012/the-european-health-report-2012-charting-the-way-to-well-being>

<http://eco.iarc.fr/EUCAN/Country.aspx?ISOCountryCd=250>

[http://www.ligue-cancer.net/article/9523\\_le-cancer-en-france#.Ufkl1NeGHk](http://www.ligue-cancer.net/article/9523_le-cancer-en-france#.Ufkl1NeGHk)

[www.invs.sante.fr/beh/2011/22/beh\\_22\\_2011.pdf](http://www.invs.sante.fr/beh/2011/22/beh_22_2011.pdf)

Altmeyer, A. et al., 2011. Cell death after high-LET irradiation in orthotopic human hepatocellular carcinoma in vivo. *In vivo (Athens, Greece)*, 25(1), pp.1–9.

Altmeyer, A. et al., 2010. Pharmacological enhancement of autophagy induced in a hepatocellular carcinoma cell line by high-LET radiation. *Anticancer research*, 30(2), pp.303–310.

Andersson, H. et al., 2001. Comparison of the therapeutic efficacy of <sup>211</sup>At- and <sup>131</sup>I-labelled monoclonal antibody MOv18 in nude mice with intraperitoneal growth of human ovarian cancer. *Anticancer research*, 21(1A), pp.409–412.

Andersson, H. et al., 2009. Intraperitoneal  $\alpha$ -Particle Radioimmunotherapy of Ovarian Cancer Patients: Pharmacokinetics and Dosimetry of <sup>211</sup>At-MX35 F(ab')<sub>2</sub>-A Phase I Study. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 50(7), pp.1153–1160.

Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Criollo, A., et al., 2007a. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunological reviews*, 220, pp.47–59.

Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., et al., 2007b. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature Medicine*, 13(9), pp.1050–1059.

Autsavapromporn, N. et al., 2011. The Role of Gap Junction Communication and Oxidative Stress in the Propagation of Toxic Effects among High-Dose  $\alpha$ -Particle-Irradiated Human Cells. *Radiation Research*, 175(3), pp.347–357.

Backer, J.M., 2008. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochemical Journal*, 410(1), p.1.

Baidoo, K.E., Yong, K. & Brechbiel, M.W., 2013. Molecular Pathways: Targeted  $\alpha$ -Particle Radiation Therapy. *Clinical Cancer Research*, 19(3), pp.530–537.

Barcellos-Hoff, M.H. et al., 1994. Transforming growth factor-beta activation in irradiated

- murine mammary gland. *Journal of Clinical Investigation*, 93(2), pp.892–899.
- Barendsen, G.W. & Broerse, J.J., 1966. Dependence of the Oxygen Effect on the Energy of Fast Neutrons. *Nature*. Available at:  
<http://www.nature.com.gate2.inist.fr/nature/journal/v212/n5063/abs/212722b0.html>.
- Barth, S., Glick, D. & Macleod, K.F., 2010. Autophagy: assays and artifacts. *The Journal of Pathology*, 221(2), pp.117–124.
- Bauman, G. et al., 2005. Radiopharmaceuticals for the palliation of painful bone metastasis-a systemic review. *Radiotherapy and Oncology*, 75(3), pp.258–270.
- Bayraktar, U.D. et al., 2013. Fifty Years of Melphalan Use in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 19(3), pp.344–356.
- Behr, T.M. et al., 1999. High-linear energy transfer (LET) alpha versus low-LET beta emitters in radioimmunotherapy of solid tumors: therapeutic efficacy and dose-limiting toxicity of <sup>213</sup>Bi- versus <sup>90</sup>Y-labeled CO17-1A Fab' fragments in a human colonic cancer model. *Cancer Research*, 59(11), pp.2635–2643.
- Behr, T.M. et al., 1997. Overcoming the nephrotoxicity of radiometal-labeled immunoconjugates: improved cancer therapy administered to a nude mouse model in relation to the internal radiation dosimetry. *Cancer*, 80(12 Suppl), pp.2591–2610.
- Behr, T.M. et al., 1998. Therapeutic efficacy and dose-limiting toxicity of Auger-electron vs. beta emitters in radioimmunotherapy with internalizing antibodies: evaluation of <sup>125</sup>I- <sup>131</sup>I-labeled CO17-1A in a human colorectal cancer model. *International Journal of Cancer*, 76(5), pp.738–748.
- Beijnum, J.R., Buurman, W.A. & Griffioen, A.W., 2008. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis*, 11(1), pp.91–99.
- Biswas, S. et al., 2007. Inhibition of TGF- $\beta$  with neutralizing antibodies prevents radiation-induced acceleration of metastatic cancer progression. *Journal of Clinical Investigation*, 117(5), pp.1305–1313.
- Bloomer, W.D. & Adelstein, S.J., 1977. <sup>5</sup>-<sup>125</sup>I-iododeoxyuridine as prototype for radionuclide therapy with Auger emitters. *Nature*, 265(5595), pp.620–621.
- Bloomer, W.D. et al., 1984. <sup>211</sup>At radiocolloid therapy: further observations and comparison with radiocolloids of <sup>32</sup>P, <sup>165</sup>Dy, and <sup>90</sup>Y. *Radiation Oncology Biology*, 10(3), pp.341–348.
- Boyd, M. et al., 2006. Radiation-induced biologic bystander effect elicited in vitro by targeted radiopharmaceuticals labeled with alpha-, beta-, and auger electron-emitting radionuclides. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 47(6), pp.1007–1015.
- Brechbiel, M.W., 2008. Bifunctional chelates for metal nuclides. *The quarterly journal of*

*nuclear medicine and molecular imaging : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR), [and] Section of the Society of Radiopharmaceutical Chemistry and Biology, 52(2), pp.166–173.*

- Brechbiel, M.W., 2007. Targeted alpha-therapy: past, present, future? *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)*, (43), pp.4918–4928.
- Brody, J.D. et al., 2010. In Situ Vaccination With a TLR9 Agonist Induces Systemic Lymphoma Regression: A Phase I/II Study. *Journal of Clinical Oncology*, 28(28), pp.4324–4332.
- Burnette, B.C. et al., 2011. The Efficacy of Radiotherapy Relies upon Induction of Type I Interferon-Dependent Innate and Adaptive Immunity. *Cancer Research*, 71(7), pp.2488–2496.
- Campana, L., Bosurgi, L. & Rovere-Querini, P., 2008. HMGB1: a two-headed signal regulating tumor progression and immunity. *Current Opinion in Immunology*, 20(5), pp.518–523.
- Camphausen, K. et al., 2003. Radiation abscopal antitumor effect is mediated through p53. *Cancer Research*, 63(8), pp.1990–1993.
- Camphausen, K. et al., 2001. Radiation therapy to a primary tumor accelerates metastatic growth in mice. *Cancer Research*, 61(5), pp.2207–2211.
- Castedo, M. et al., 2004. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, 23(16), pp.2825–2837.
- Chaachouay, H. et al., 2011. Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation. *Radiotherapy and Oncology*, 99(3), pp.287–292.
- Chakraborty, M. et al., 2004. External beam radiation of tumors alters phenotype of tumor cells to render them susceptible to vaccine-mediated T-cell killing. *Cancer Research*, 64(12), pp.4328–4337.
- Chakraborty, M. et al., 2003. Irradiation of tumor cells up-regulates Fas and enhances CTL lytic activity and CTL adoptive immunotherapy. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170(12), pp.6338–6347.
- Chakraborty, M., Gelbard, A., et al., 2008a. Use of radiolabeled monoclonal antibody to enhance vaccine-mediated antitumor effects. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 57(8), pp.1173–1183.
- Chakraborty, M., Wansley, E.K., et al., 2008b. The Use of Chelated Radionuclide (Samarium-153-Ethylenediaminetetramethylenephosphonate) to Modulate Phenotype of Tumor Cells and Enhance T Cell-Mediated Killing. *Clinical Cancer Research*, 14(13), pp.4241–4249.
- Chakravarty, P.K. et al., 1999. Flt3-ligand administration after radiation therapy prolongs survival in a murine model of metastatic lung cancer. *Cancer Research*, 59(24), pp.6028–6032.

- Chang, S.-H. et al., 2012. Beclin1-induced Autophagy Abrogates Radioresistance of Lung Cancer Cells by Suppressing Osteopontin. *Journal of Radiation Research*.
- Chatal, J.F. et al., 2006. Survival Improvement in Patients With Medullary Thyroid Carcinoma Who Undergo Pretargeted Anti-Carcinoembryonic-Antigen Radioimmunotherapy: A Collaborative Study With the French Endocrine Tumor Group. *Journal of Clinical Oncology*, 24(11), pp.1705–1711.
- Chérel, M. et al., 2013. <sup>213</sup>Bi Radioimmunotherapy with an Anti-mCD138 Monoclonal Antibody in a Murine Model of Multiple Myeloma. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, pp.1–9.
- Chung, H. et al., 2009. Serum high mobility group box-1 (HMGB1) is closely associated with the clinical and pathologic features of gastric cancer. *Journal of Translational Medicine*, 7(1), p.38.
- Cordier, D. et al., 2010. Targeted alpha-radionuclide therapy of functionally critically located gliomas with <sup>213</sup>Bi-DOTA-[Thi8, Met(O2)11]-substance P: a pilot trial. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 37(7), pp.1335–1344.
- Costantini, D.L. et al., 2010. Antitumor Effects and Normal-Tissue Toxicity of <sup>111</sup>In-Nuclear Localization Sequence-Trastuzumab in Athymic Mice Bearing HER-Positive Human Breast Cancer Xenografts. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 51(7), pp.1084–1091.
- Couturier, O. et al., 2005. Cancer radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 32(5), pp.601–614.
- Couturier, O. et al., 1999. Validation of <sup>213</sup>Bi-alpha radioimmunotherapy for multiple myeloma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 5(10 Suppl), pp.3165s–3170s.
- d'Adda di Fagagna, F., 2008. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature reviews. Cancer*, 8(7), pp.512–522.
- De Ruysscher, D. et al., 2012. Charged particles in radiotherapy: A 5-year update of a systematic review. *Radiotherapy and Oncology*, 103(1), pp.5–7.
- Del Bello, B. et al., 2013. Cisplatin-Induced Apoptosis Inhibits Autophagy, Which Acts as a Pro-Survival Mechanism in Human Melanoma Cells I. V. Lebedeva, ed. *PLoS ONE*, 8(2), p.e57236.
- Delaney, G. et al., 2005. The role of radiotherapy in cancer treatment. *Cancer*, 104(6), pp.1129–1137.
- Demaria, S. et al., 2005. Immune-mediated inhibition of metastases after treatment with local radiation and CTLA-4 blockade in a mouse model of breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11(2 Pt 1), pp.728–734.
- Demaria, S. et al., 2004. Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *International Journal of Radiation*

*Oncology\*Biology\*Physics*, 58(3), pp.862–870.

- Dewan, M.Z. et al., 2009. Fractionated but Not Single-Dose Radiotherapy Induces an Immune-Mediated Abscopal Effect when Combined with Anti-CTLA-4 Antibody. *Clinical Cancer Research*, 15(17), pp.5379–5388.
- Diamantopoulos, S. et al., 2011. Clinical implementation of total skin electron beam (TSEB) therapy: A review of the relevant literature. *Physica Medica*, 27(2), pp.62–68.
- Dunn, G.P. et al., 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology*, 3(11), pp.991–998.
- Dunn, G.P., Old, L.J. & Schreiber, R.D., 2004. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annual Review of Immunology*, 22(1), pp.329–360.
- Durante, M. & Loeffler, J.S., 2009. Charged particles in radiation oncology. *Nature Publishing Group*, 7(1), pp.37–43.
- Elgqvist, J. et al., 2006. Alpha-radioimmunotherapy of intraperitoneally growing OVCAR-3 tumors of variable dimensions: Outcome related to measured tumor size and mean absorbed dose. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 47(8), pp.1342–1350.
- Elgqvist, J. et al., 2005. Therapeutic efficacy and tumor dose estimations in radioimmunotherapy of intraperitoneally growing OVCAR-3 cells in nude mice with (211)At-labeled monoclonal antibody MX35. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 46(11), pp.1907–1915.
- Elliott, M.R. et al., 2009. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*, 461(7261), pp.282–286.
- Finkelstein, S.E. et al., 2012. Combination of External Beam Radiotherapy (EBRT) with Intratumoral Injection of Dendritic Cells as Neo-Adjuvant Treatment of High-Risk Soft Tissue Sarcoma Patients. *Radiation Oncology Biology*, 82(2), pp.924–932.
- Fisher, B. et al., 2002. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *The New England journal of medicine*, 347(16), pp.1233–1241.
- Forastiere, A.A. et al., 2003. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *The New England journal of medicine*, 349(22), pp.2091–2098.
- Forbes, S. et al., 2006. COSMIC 2005. *British journal of cancer*, 94(2), pp.318–322.
- Formenti, S.C. & Demaria, S., 2012. Combining radiotherapy and Cancer Immunotherapy: a Paradigm Shift. *J Natl Cancer Inst*, pp.1–10.
- Formenti, S.C. & Demaria, S., 2009. Systemic effects of local radiotherapy. *Lancet Oncology*, 10(7), pp.718–726.
- Friesen, C. et al., 2013. Anti-CD33-antibodies labelled with the alpha-emitter Bismuth-213

- kill CD33-positive acute myeloid leukaemia cells specifically by activation of caspases and break radio- and chemoresistance by inhibition of the anti-apoptotic proteins X-linked inhibitor of apoptosis protein and B-cell lymphoma-extra large. *European Journal of Cancer*, 49(11), pp.2542–2554.
- Friesen, C. et al., 2007. Breaking Chemoresistance and Radioresistance with [213Bi]anti-CD45 Antibodies in Leukemia Cells. *Cancer Research*, 67(5), pp.1950–1958.
- Gadbois, D.M. et al., 1996. Alterations in the progression of cells through the cell cycle after exposure to alpha particles or gamma rays. *Radiation Research*, 146(4), pp.414–424.
- Galluzzi, L. et al., 2011. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. 19(1), pp.107–120.
- Gardai, S.J. et al., 2005. Cell-Surface Calreticulin Initiates Clearance of Viable or Apoptotic Cells through trans-Activation of LRP on the Phagocyte. *Cell*, 123(2), pp.321–334.
- Garg, A.D. et al., 2010. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: An emerging amalgamation. *BBA - Reviews on Cancer*, 1805(1), pp.53–71.
- Garnett, C.T. et al., 2004. Sublethal irradiation of human tumor cells modulates phenotype resulting in enhanced killing by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Research*, 64(21), pp.7985–7994.
- Gerber, D.E. & Chan, T.A., 2008. Recent advances in radiation therapy. *American family physician*, 78(11), pp.1254–1262.
- Ghiringhelli, F. et al., 2009. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 $\beta$ -dependent adaptive immunity against tumors. *Nature Medicine*, 15(10), pp.1170–1178.
- Goodhead, D.T., 1999. Mechanisms for the biological effectiveness of high-LET radiations. *Journal of Radiation Research*, 40 Suppl, pp.1–13.
- Gozuacik, D. & Kimchi, A., 2004. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, 23(16), pp.2891–2906.
- Gulenchyn, K.Y. et al., 2012. Radionuclide Therapy in Neuroendocrine Tumours: A Systematic Review. *Clinical Oncology*, 24(4), pp.294–308.
- Gulley, J.L. et al., 2005. Combining a recombinant cancer vaccine with standard definitive radiotherapy in patients with localized prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11(9), pp.3353–3362.
- H Yi, D. & Appel, S., 2013. Current Status and Future Perspectives of Dendritic Cell-Based Cancer Immunotherapy. *Scandinavian Journal of Immunology*, 78(2), pp.167–171.
- Haimovitz-Friedman, A. et al., 1994. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *The Journal of experimental medicine*, 180(2), pp.525–535.
- Hallahan, D.E. et al., 1989. Increased tumor necrosis factor alpha mRNA after cellular

- exposure to ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(24), pp.10104–10107.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), pp.646–674.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), pp.57–70.
- Haro, K.J., Scott, A.C. & Scheinberg, D.A., 2012. Mechanisms of resistance to high and low linear energy transfer radiation in myeloid leukemia cells. *Blood*, 120(10), pp.2087–2097.
- Hepel, J.T. & Wazer, D.E., 2012. A comparison of brachytherapy techniques for partial breast irradiation. *Brachytherapy*, 11(3), pp.163–175.
- Hiniker, S.M., Chen, D.S. & Knox, S.J., 2012. Abscopal effect in a patient with melanoma. *The New England journal of medicine*, 366(21), pp.2035–author reply 2035–6.
- Hoang, B. et al., 2009. Effect of autophagy on multiple myeloma cell viability. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(7), pp.1974–1984.
- Hodge, J.W., Sharp, H.J. & Gameiro, S.R., 2012. Abscopal Regression of Antigen Disparate Tumors by Antigen Cascade After Systemic Tumor Vaccination in Combination with Local Tumor Radiation. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, 27(1), pp.12–22.
- Hoeijmakers, J.H., 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835), pp.366–374.
- Huang, C.-Y. et al., 2012. Microdosimetry for Targeted Alpha Therapy of Cancer. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2012(4), pp.1–6.
- Humm, J.L. & Cobb, L.M., 1990. Nonuniformity of tumor dose in radioimmunotherapy. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 31(1), pp.75–83.
- Hurt, E.M. et al., 2006. Reversal of p53 epigenetic silencing in multiple myeloma permits apoptosis by a p53 activator. *Cancer biology & therapy*, 5(9), pp.1154–1160.
- Jaber, N. et al., 2012. Class III PI3K Vps34 plays an essential role in autophagy and in heart and liver function. *PNAS*, 109(6), pp.2003–2008.
- Jackson, S.P., 2002. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, 23(5), pp.687–696.
- Jones, B., Dale, R.G. & Cárabe-Fernández, A., 2009. Charged particle therapy for cancer: The inheritance of the Cavendish scientists? *Applied Radiation and Isotopes*, 67(3), pp.371–377.
- Jurcic, J.G. et al., 2002. Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. *Blood*, 100(4), pp.1233–1239.
- Kachikwu, E.L. et al., 2011. Radiation Enhances Regulatory T Cell Representation. *Radiation Oncology Biology*, 81(4), pp.1128–1135.

- Kaminski, M.S. et al., 2005. 131I-tositumomab therapy as initial treatment for follicular lymphoma. *The New England journal of medicine*, 352(5), pp.441–449.
- Kandouz, M., 2011. Hopes and Disillusions in Therapeutic Targeting of Intercellular Communication in Cancer. In K. Chunsheng, ed. *Gene Therapy - Developments and Future Perspectives*. InTech.
- Kang, R. et al., 2011. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 18(4), pp.571–580.
- Kassis, A.I., 2004. The amazing world of auger electrons. *International Journal of Radiation Biology*, 80(11-12), pp.789–803.
- Kassis, A.I., 2008. Therapeutic Radionuclides: Biophysical and Radiobiologic Principles. *Seminars in Nuclear Medicine*, 38(5), pp.358–366.
- Kim, J.-Y. et al., 2006. Increase of NKG2D ligands and sensitivity to NK cell-mediated cytotoxicity of tumor cells by heat shock and ionizing radiation. *Experimental & molecular medicine*, 38(5), pp.474–484.
- Kim, K.W. et al., 2009. Combined Bcl-2/Mammalian Target of Rapamycin Inhibition Leads to Enhanced Radiosensitization via Induction of Apoptosis and Autophagy in Non-Small Cell Lung Tumor Xenograft Model. *Clinical Cancer Research*, 15(19), pp.6096–6105.
- Kneifel, S., 2006. Local Targeting of Malignant Gliomas by the Diffusible Peptidic Vector 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1-Glutaric Acid-4,7,10-Triacetic Acid-Substance P. *Clinical Cancer Research*, 12(12), pp.3843–3850.
- Kolesnick, R. & Fuks, Z., 2003. Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene*, 22(37), pp.5897–5906.
- Kraeber-Bodéré, F. et al., 2010. Pretargeted radioimmunotherapy in rapidly progressing, metastatic, medullary thyroid cancer D. M. Goldenberg, ed. *Cancer*, 116(S4), pp.1118–1125.
- Kramer, K. et al., 2007. Phase I Study of Targeted Radioimmunotherapy for Leptomeningeal Cancers Using Intra-Ommaya 131-I-3F8. *Journal of Clinical Oncology*, 25(34), pp.5465–5470.
- Kroemer, G. et al., 2008. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), pp.3–11.
- Kroemer, G. et al., 2013. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annual Review of Immunology*, 31(1), pp.51–72.
- Kuniyasu, H. et al., 2002. Expression of receptors for advanced glycation end-products (RAGE) is closely associated with the invasive and metastatic activity of gastric cancer. *The Journal of Pathology*, 196(2), pp.163–170.
- Kuo, L.J. & Yang, L.-X., 2008. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In vivo (Athens, Greece)*, 22(3), pp.305–309.

- Lakshmanagowda, P. et al., 2009. Abscopal effect in a patient with chronic lymphocytic leukemia during radiation therapy: a case report. *Cases Journal*, 2(1), p.204.
- Landsverk, K.S. et al., 2011. Three independent mechanisms for arrest in G<sub>2</sub> after ionizing radiation. *Cell Cycle*, 10(5), pp.819–829.
- Langley, S. et al., 2012. Report of a consensus meeting on focal low dose rate brachytherapy for prostate cancer. *BJU international*, 109 Suppl 1, pp.7–16.
- Le Doussal, J.M. et al., 1989. In vitro and in vivo targeting of radiolabeled monovalent and divalent haptens with dual specificity monoclonal antibody conjugates: enhanced divalent hapten affinity for cell-bound antibody conjugate. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 30(8), pp.1358–1366.
- Liao, W., Lin, J.-X. & Leonard, W.J., 2013. Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy. *Immunity*, 38(1), pp.13–25.
- Lindén, O. et al., 2005. Dose-fractionated radioimmunotherapy in non-Hodgkin's lymphoma using DOTA-conjugated, <sup>90</sup>Y-radiolabeled, humanized anti-CD22 monoclonal antibody, epratuzumab. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11(14), pp.5215–5222.
- Lizée, G. et al., 2013. Harnessing the Power of the Immune System to Target Cancer. *Annual Review of Medicine*, 64(1), pp.71–90.
- Lomax, A.J. et al., 1999. A treatment planning inter-comparison of proton and intensity modulated photon radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology*, 51(3), pp.257–271.
- Lomonaco, S.L. et al., 2009. The induction of autophagy by  $\gamma$ -radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cells. *International Journal of Cancer*, 125(3), pp.717–722.
- Lord, C.J. & Ashworth, A., 2012. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, 481(7381), pp.287–294.
- Lugade, A.A. et al., 2008. Radiation-induced IFN-gamma production within the tumor microenvironment influences antitumor immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(5), pp.3132–3139.
- Lücke-Huhle, C., 1982. Alpha-irradiation-induced G<sub>2</sub> delay: a period of cell recovery. *Radiation Research*, 89(2), pp.298–308.
- Macklis, R.M. et al., 1992. Cellular kinetics, dosimetry, and radiobiology of alpha-particle radioimmunotherapy: induction of apoptosis. *Radiation Research*, 130(2), pp.220–226.
- Matsumura, S. et al., 2008. Radiation-induced CXCL16 release by breast cancer cells attracts effector T cells. *The Journal of Immunology*, 181(5), pp.3099–3107.
- Matzinger, P., 2002. The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science*, 296(5566), pp.301–305.
- Maucort-Boulch, D. et al., 2010. Rationale for carbon ion therapy in high-grade glioma based

- on a review and a meta-analysis of neutron beam trials. *Cancer/Radiothérapie*, 14(1), pp.34–41.
- Mellman, I., Coukos, G. & Dranoff, G., 2011. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, 480(7378), pp.480–489.
- Michael Goitein, 2010. Trials and tribulations in charged particle radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology*, 95(1), pp.23–31.
- Michallet, A.-S. et al., 2011. Compromising the Unfolded Protein Response Induces Autophagy-Mediated Cell Death in Multiple Myeloma Cells R. E. Means, ed. *PLoS ONE*, 6(10), p.e25820.
- Michaud, M. et al., 2011. Autophagy-Dependent Anticancer Immune Responses Induced by Chemotherapeutic Agents in Mice. *Science*, 334(6062), pp.1573–1577.
- Mizushima, N. & Yoshimori, T., 2007. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 3(6), pp.542–545.
- Morgan, W.F., 2003. Is there a common mechanism underlying genomic instability, bystander effects and other nontargeted effects of exposure to ionizing radiation? *Oncogene*, 22(45), pp.7094–7099.
- Mothersill, C. & Seymour, C.B., 2004. Radiation-induced bystander effects--implications for cancer. *Nature reviews. Cancer*, 4(2), pp.158–164.
- Mulford, D.A., Scheinberg, D.A. & Jurcic, J.G., 2005. The promise of targeted {alpha}-particle therapy. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 46 Suppl 1, pp.199S–204S.
- Murad, A. et al., 2011. The use of brachytherapy in the treatment of nonmelanoma skin cancer: A review. *Journal of American Dermatology*, 65(2), pp.377–388.
- Nagasawa, H. & Little, J.B., 1992. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Research*, 52(22), pp.6394–6396.
- Nikula, T.K. et al., 1995. A rapid, single vessel method for preparation of clinical grade ligand conjugated monoclonal antibodies. *Nuclear Medicine and Biology*, 22(3), pp.387–390.
- Obeid, M. et al., 2006. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nature Medicine*, 13(1), pp.54–61.
- Obeid, M. et al., 2007. Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of  $\gamma$ -irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 14(10), pp.1848–1850.
- Ochakovskaya, R. et al., 2001. Therapy of disseminated B-cell lymphoma xenografts in severe combined immunodeficient mice with an anti-CD74 antibody conjugated with (111)indium, (67)gallium, or (90)yttrium. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 7(6), pp.1505–1510.

- Ogawa, K. et al., 2013. Radiotherapy targeting cancer stem cells: current views and future perspectives. *Anticancer research*, 33(3), pp.747–754.
- Okada, H. & Mak, T.W., 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nature reviews. Cancer*, 4(8), pp.592–603.
- Okayasu, R., 2011. Repair of DNA damage induced by accelerated heavy ions-A mini review. *International Journal of Cancer*, 130(5), pp.991–1000.
- Okroj, M., Österborg, A. & Blom, A.M., 2013. Effector mechanisms of anti-CD20 monoclonal antibodies in B cell malignancies. *Cancer Treatment Reviews*, 39(6), pp.632–639.
- Okuma, K. et al., 2011. Abscopal effect of radiation on lung metastases of hepatocellular carcinoma: a case report. *Journal of Medical Case Reports*, 5(1), p.111.
- Orozco, J.J. et al., 2013. Anti-CD45 radioimmunotherapy using 211At with bone marrow transplantation prolongs survival in a disseminated murine leukemia model. *Blood*, 121(18), pp.3759–3767.
- Pagel, J.M. et al., 2009. Allogeneic hematopoietic cell transplantation after conditioning with 131I-anti-CD45 antibody plus fludarabine and low-dose total body irradiation for elderly patients with advanced acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood*, 114(27), pp.5444–5453.
- Palayoor, S.T. et al., 1993. G2M arrest and apoptosis in murine T lymphoma cells following exposure to 212Bi alpha particle irradiation. *Nuclear Medicine and Biology*, 20(6), pp.795–805.
- Palumbo, S. & Comincini, S., 2012. Autophagy and ionizing radiation in tumors: The “survive or not survive” dilemma. *Journal of Cellular Physiology*, 228(1), pp.1–8.
- Pardoll, D.M., 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. pp.1–13.
- Pattingre, S. et al., 2005. Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy. *Cell*, 122(6), pp.927–939.
- Peggs, K.S., Quezada, S.A. & Allison, J.P., 2009. Cancer immunotherapy: co-stimulatory agonists and co-inhibitory antagonists. *Clinical & Experimental Immunology*, 157(1), pp.9–19.
- Postow, M.A. et al., 2012. Immunologic correlates of the abscopal effect in a patient with melanoma. *The New England journal of medicine*, 366(10), pp.925–931.
- Pouget, J.-P. et al., 2008. Cell membrane is a more sensitive target than cytoplasm to dense ionization produced by auger electrons. *Radiation Research*, 170(2), pp.192–200.
- Raab, M.S. et al., 2009. Multiple myeloma. *The Lancet*, 374(9686), pp.324–339.
- Radl, J. et al., 1988. Animal model of human disease. Multiple myeloma. *The American journal of pathology*, 132(3), pp.593–597.

- Raja, C. et al., 2007. Interim analysis of toxicity and response in phase 1 trial of systemic targeted alpha therapy for metastatic melanoma. *Cancer biology & therapy*, 6(6), pp.846–852.
- Rajkumar, S.V. et al., 2005. Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma. *Blood*, 106(13), pp.4050–4053.
- Reits, E.A. et al., 2006. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *Journal of Experimental Medicine*, 203(5), pp.1259–1271.
- Restifo, N.P., Dudley, M.E. & Rosenberg, S.A., 2012. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nature Reviews Immunology*, 12(4), pp.269–281.
- Richardson, P.G. et al., 2003. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *The New England journal of medicine*, 348(26), pp.2609–2617.
- Riley, P.A., 1994. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 65(1), pp.27–33.
- Ringborg, U. et al., 2003. The Swedish Council on Technology Assessment in Health Care (SBU) systematic overview of radiotherapy for cancer including a prospective survey of radiotherapy practice in Sweden 2001--summary and conclusions. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, 42(5-6), pp.357–365.
- Robbins, R.J. et al., 2005. The Evolving Role of <sup>131</sup>I for the Treatment of Differentiated Thyroid Carcinoma. *THE JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE*, Vol. 46(No. 1), pp.1–10.
- Rose, A.C. et al., 2012. A Systematic Literature Review and Meta-Analysis of Radioimmunotherapy Consolidation for Patients With Untreated Follicular Lymphoma. *CLML*, 12(6), pp.393–399.
- Rosenberg, S.A. et al., 2011. Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T-Cell Transfer Immunotherapy. *Clinical Cancer Research*, 17(13), pp.4550–4557.
- Rosenblat, T.L. et al., 2010. Sequential Cytarabine and  $\alpha$ -Particle Immunotherapy with Bismuth-213-Lintuzumab (HuM195) for Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research*, 16(21), pp.5303–5311.
- Rothenberg, C. et al., 2010. Ubiquitin functions in autophagy and is degraded by chaperone-mediated autophagy. *Human Molecular Genetics*, 19(16), pp.3219–3232.
- Sadeghi, M., Enferadi, M. & Shirazi, A., 2010. External and internal radiation therapy: Past and future directions. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 6(3), p.239.
- Sanford, K.K. et al., 1986. Chromosomal radiosensitivity during the G2 cell cycle period and cytopathology of human normal x tumor cell hybrids. *Cancer Research*, 46(4 Pt 2), pp.2045–2049.
- Santoro, L. et al., 2009. Noninternalizing Monoclonal Antibodies Are Suitable Candidates for

- 125I Radioimmunotherapy of Small-Volume Peritoneal Carcinomatosis. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 50(12), pp.2033–2041.
- Sasahira, T. et al., 2005. Expression of receptor for advanced glycation end products and HMGB1/amphoterin in colorectal adenomas. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 446(4), pp.411–415.
- Scaffidi, P., Misteli, T. & Bianchi, M.E., 2002. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 418(6894), pp.191–195.
- Schreiber, R.D., Old, L.J. & Smyth, M.J., 2011. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science*, 331(6024), pp.1565–1570.
- Schulz-Ertner, D. et al., 2007. Effectiveness of Carbon Ion Radiotherapy in the Treatment of Skull-Base Chordomas. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics\**, 68(2), pp.449–457.
- Seglen, P.O. & Gordon, P.B., 1982. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(6), pp.1889–1892.
- Seideman, J.H. et al., 2011. Alpha particles induce apoptosis through the sphingomyelin pathway. *Radiation Research*, 176(4), pp.434–446.
- Seidl, C. et al., 2007. 213Bi-induced death of HSC45-M2 gastric cancer cells is characterized by G2 arrest and up-regulation of genes known to prevent apoptosis but induce necrosis and mitotic catastrophe. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(8), pp.2346–2359.
- Seidl, C. et al., 2005. Cell death triggered by alpha-emitting 213Bi-immunoconjugates in HSC45-M2 gastric cancer cells is different from apoptotic cell death. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 32(3), pp.274–285.
- Selby, M. et al., 2013. Antitumor activity of concurrent blockade of immune checkpoint molecules CTLA-4 and PD-1 in preclinical models. *Journal of Clinical Oncology*, 31. Available at: <http://meetinglibrary.asco.org/content/113653-132>.
- Sgouros, G., 2008. Alpha-particles for targeted therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(12), pp.1402–1406.
- Sgouros, G. et al., 2010. MIRD Pamphlet No. 22 (Abridged): Radiobiology and Dosimetry of -Particle Emitters for Targeted Radionuclide Therapy. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 51(2), pp.311–328.
- Sharkey, R.M. & Goldenberg, D.M., 2011. Cancer radioimmunotherapy. *Immunotherapy*, 3(3), pp.349–370.
- Sharkey, R.M. & Goldenberg, D.M., 2006. Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunoconjugates. *CA: a cancer journal for clinicians*, 56(4), pp.226–243.

- Shiraishi, K. et al., 2008. Enhancement of Antitumor Radiation Efficacy and Consistent Induction of the Abscopal Effect in Mice by ECI301, an Active Variant of Macrophage Inflammatory Protein-1. *Clinical Cancer Research*, 14(4), pp.1159–1166.
- Singhal, S. et al., 1999. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *The New England journal of medicine*, 341(21), pp.1565–1571.
- Smith, M.R., 2003. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene*, 22(47), pp.7359–7368.
- Solier, S. & Pommier, Y., 2009. The apoptotic ring: a novel entity with phosphorylated histones H2AX and H2B and activated DNA damage response kinases. *Cell Cycle*, 8(12), pp.1853–1859.
- Stewart, A.J. & Viswanathan, A.N., 2006. Current controversies in high-dose-rate versus low-dose-rate brachytherapy for cervical cancer. *Cancer*, 107(5), pp.908–915.
- Supiot, S., 2005. Mechanisms of Cell Sensitization to Radioimmunotherapy by Doxorubicin or Paclitaxel in Multiple Myeloma Cell Lines. *Clinical Cancer Research*, 11(19), pp.7047s–7052s.
- Supiot, S. et al., 2002. Comparison of the biologic effects of MA5 and B-B4 monoclonal antibody labeled with iodine-131 and bismuth-213 on multiple myeloma. *Cancer*, 94(S4), pp.1202–1209.
- Sznol, M. & Chen, L., 2013. Antagonist Antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the Treatment of Advanced Human Cancer. *Clinical Cancer Research*, 19(5), pp.1021–1034.
- Søyland, C. & Hassfjell, S.P., 2000. Survival of human lung epithelial cells following in vitro alpha-particle irradiation with absolute determination of the number of alpha-particle traversals of individual cells. *International Journal of Radiation Biology*, 76(10), pp.1315–1322.
- Takaya, M. et al., 2007. Abscopal effect of radiation on toruliform para-aortic lymph node metastases of advanced uterine cervical carcinoma--a case report. *Anticancer research*, 27(1B), pp.499–503.
- Tang, D. et al., 2012. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunological reviews*, 249, pp.1–18.
- Teyssier, F. et al., 1999. [Cell cycle regulation after exposure to ionizing radiation]. *Bulletin du cancer*, 86(4), pp.345–357.
- Tomblyn, M.B. et al., 2013. The New Golden Era for Radioimmunotherapy: Not Just for Lymphomas Anymore. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center*, Vol. 20(No. 1), pp.1–12.
- Tsai, C.-S. et al., 2007. Macrophages From Irradiated Tumors Express Higher Levels of iNOS, Arginase-I and COX-2, and Promote Tumor Growth. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics*, 68(2), pp.499–507.
- Tsuji, H. & Kamada, T., 2012. A Review of Update Clinical Results of Carbon Ion

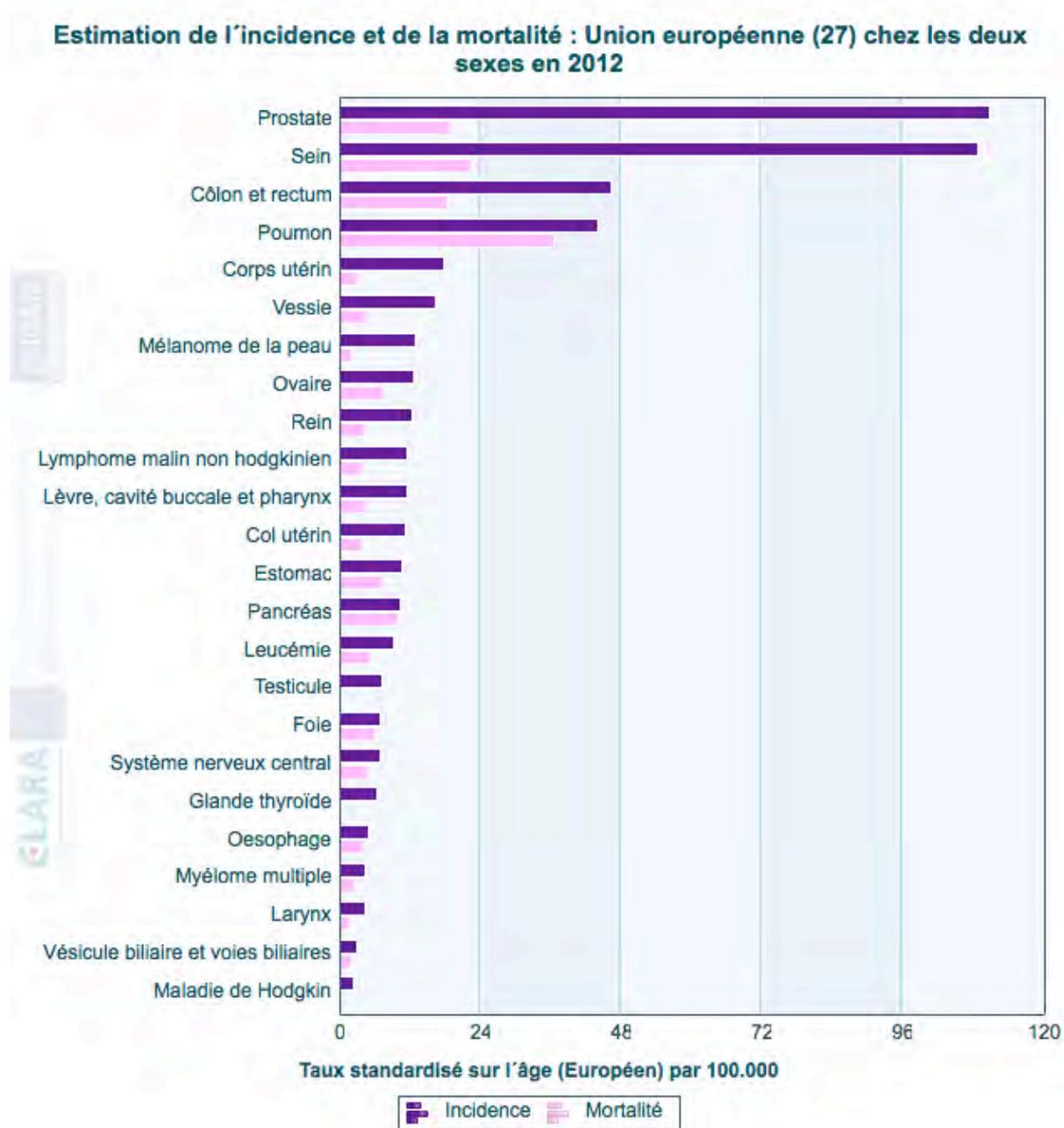
- Radiotherapy. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 42(8), pp.670–685.
- Tsujimoto, Y. & Shimizu, S., 2005. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death and Differentiation*, 12, pp.1528–1534.
- Uhl, M. et al., 2009. Autophagy within the antigen donor cell facilitates efficient antigen cross-priming of virus-specific CD8+ T cells. 16(7), pp.991–1005.
- Vakifahmetoglu, H., Olsson, M. & Zhivotovsky, B., 2008. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death and Differentiation*, 15(7), pp.1153–1162.
- Veronesi, U. et al., 2002. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *The New England journal of medicine*, 347(16), pp.1227–1232.
- Vesely, M.D. et al., 2011. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annual Review of Immunology*, 29(1), pp.235–271.
- Wan, Y.Y. & Flavell, R.A., 2007. “Yin-Yang” functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. *Immunological reviews*, 220, pp.199–213.
- Withers, H.R., 1999. Radiation biology and treatment options in radiation oncology. *Cancer Research*, 59(7 Suppl), pp.1676s–1684s.
- Witzig, T.E., 2002. Randomized Controlled Trial of Yttrium-90-Labeled Ibritumomab Tiuxetan Radioimmunotherapy Versus Rituximab Immunotherapy for Patients With Relapsed or Refractory Low-Grade, Follicular, or Transformed B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 20(10), pp.2453–2463.
- Wright, E.G. & Coates, P.J., 2006. Untargeted effects of ionizing radiation: Implications for radiation pathology. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 597(1-2), pp.119–132.
- Wu, Y.T. et al., 2010. Dual Role of 3-Methyladenine in Modulation of Autophagy via Different Temporal Patterns of Inhibition on Class I and III Phosphoinositide 3-Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 285(14), pp.10850–10861.
- Yamamoto, A. et al., 1998. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell structure and function*, 23(1), pp.33–42.
- Yang, G.-L. et al., 2012. Increased expression of HMGB1 is associated with poor prognosis in human bladder cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 106(1), pp.57–61.
- Yang, Z. & Klionsky, D.J., 2010. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nature Publishing Group*, 12(9), pp.814–822.
- Ylä-Anttila, P. et al., 2009. *Chapter 10 - Monitoring Autophagy by Electron Microscopy in Mammalian Cells* 1st ed, Elsevier Inc.
- Yong, K.J. et al., 2012. 212Pb-Radioimmunotherapy Induces G2 Cell-Cycle Arrest and Delays DNA Damage Repair in Tumor Xenografts in a Model for Disseminated

Intraperitoneal Disease. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(3), pp.639–648.

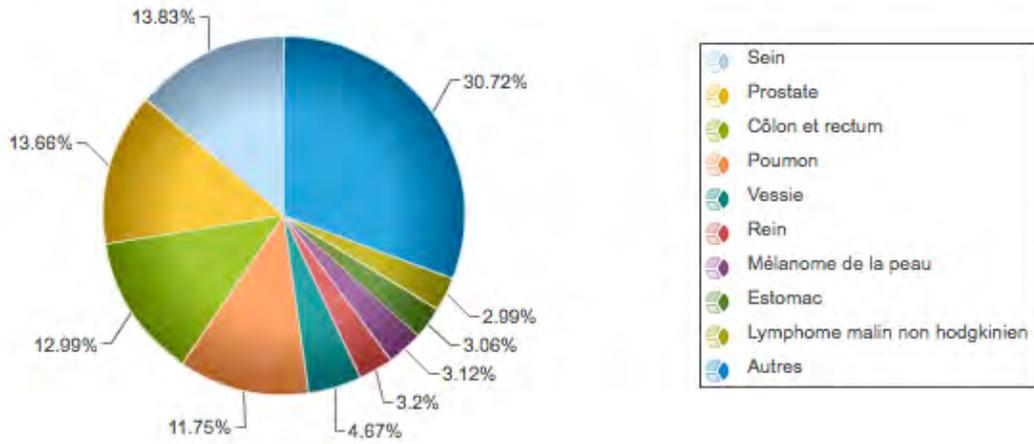
Zalutsky, M.R. et al., 2007. Clinical Experience with  $\alpha$ -Particle Emitting  $^{211}\text{At}$ : Treatment of Recurrent Brain Tumor Patients with  $^{211}\text{At}$ -Labeled Chimeric Antitenascin Monoclonal Antibody 81C6. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 49(1), pp.30–38.

## Annexes

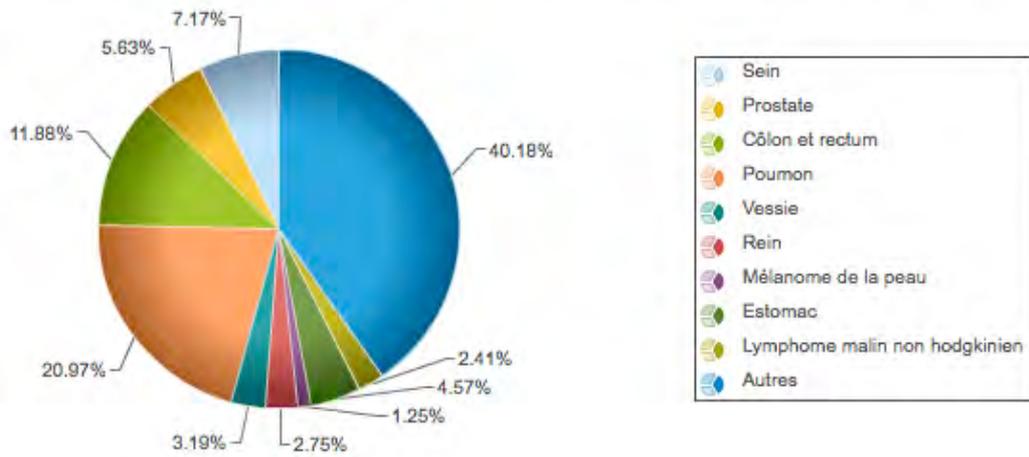
### 1. Statistiques du cancer en Europe



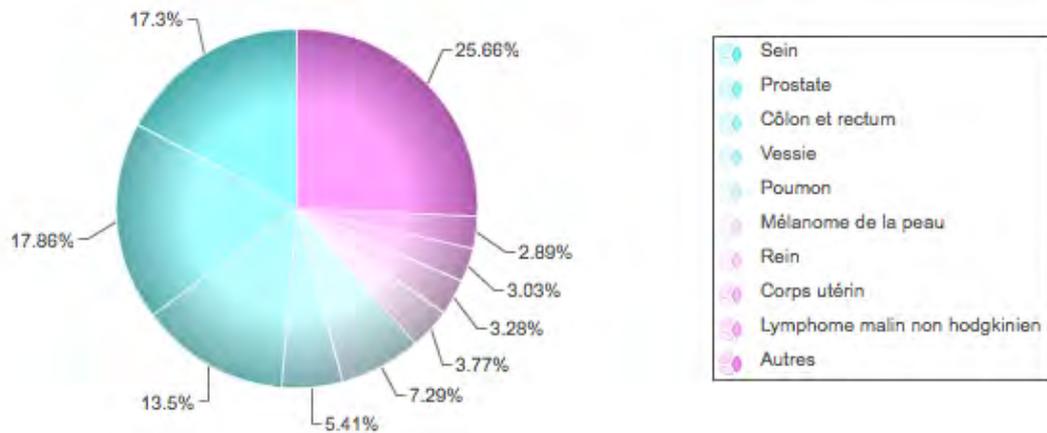
**Estimation de l'incidence : Union européenne (27) chez les deux sexes en 2012**



**Estimation de la mortalité : Union européenne (27) chez les deux sexes en 2012**



**Estimation de la prévalence (1-année) : Union européenne (27) chez les deux sexes en 2012**

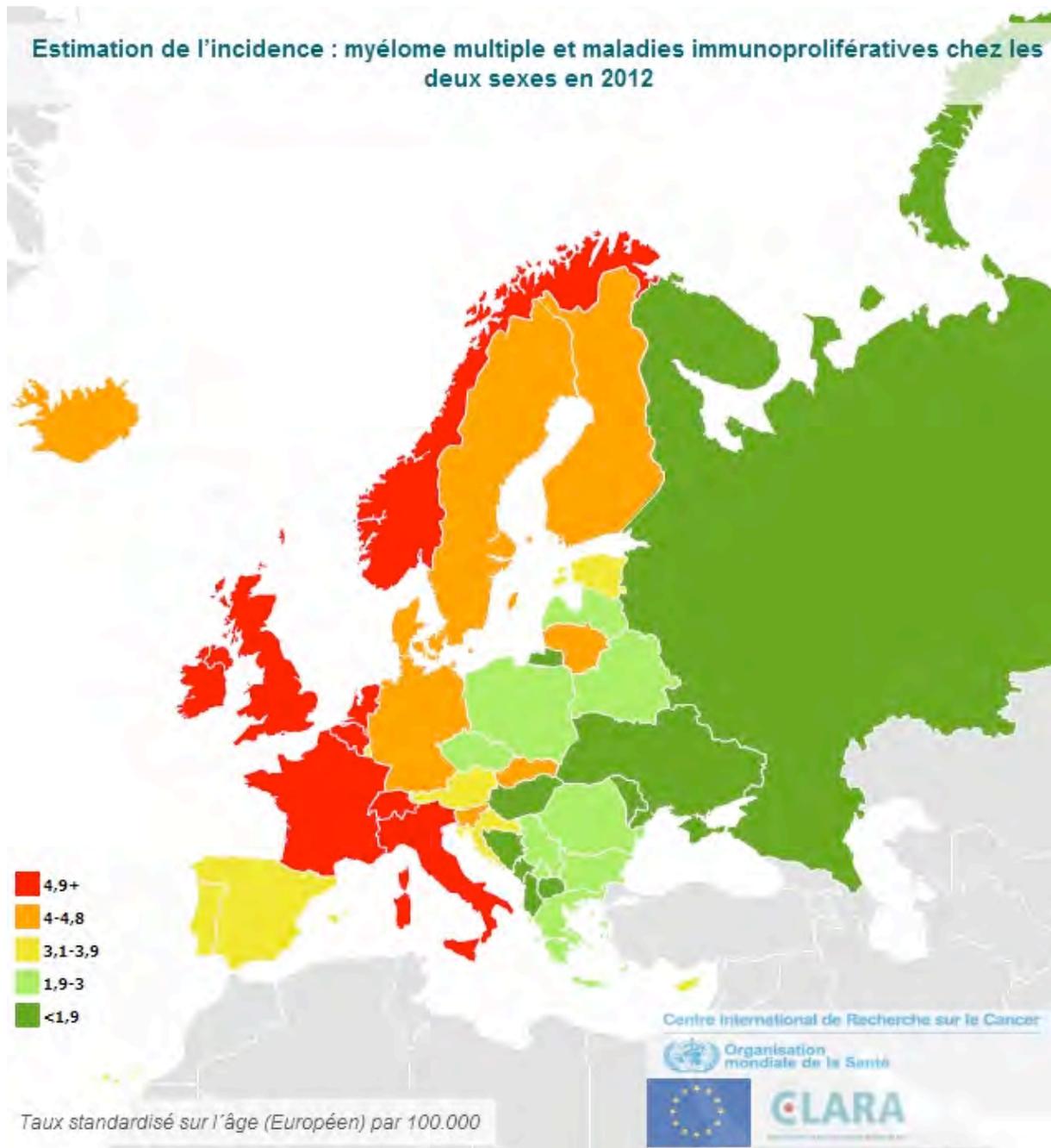




Estimation de l'incidence et de la mortalité : Union européenne (27) chez les deux sexes en 2012

Cancer	Incidence		Mortalité		Prévalence		
	Nombre	Taux	Nombre	Taux	1-année	3-année	5-année
Col utérin	33354	11,3	12977	3,7	28008	75132	114136
Côlon et rectum	342137	46,3	149984	18,4	255719	644626	943865
Corps utérin	64331	17,9	14675	3,3	57426	157183	242071
Estomac	80626	10,7	57654	7,3	38798	86151	117783
Foie	51319	7,0	47989	6,2	20168	37981	46480
Glande thyroïde	36864	6,5	3602	0,4	31228	90262	146631
Larynx	27955	4,4	12043	1,8	23991	62582	92808
Leucémie	62222	9,2	41105	5,2	37552	93254	136202
Lèvre, cavité buccale et pharynx	73014	11,6	28171	4,3	55833	137292	196468
Lymphome malin non hodgkinien	78768	11,6	30414	3,8	54680	140868	210509
Maladie de Hodgkin	12271	2,3	2673	0,4	8970	25689	41366
Mélanome de la peau	82075	13,0	15725	2,2	71474	204018	323467
Myélome multiple	33413	4,5	20318	2,5	24865	57167	76751
Oesophage	34534	5,0	29626	4,1	15201	30008	37815
Ovaire	44149	12,6	29758	7,4	30772	73960	103729
Pancréas	78654	10,5	77940	10,1	20644	36224	43194
Poumon	309589	44,1	264782	36,5	138062	269330	336143
Prostate	359942	110,8	71023	18,9	338189	896194	1335884
Rein	84394	12,4	34720	4,5	62101	162715	246235
Sein	364449	108,8	90575	22,4	327706	926377	1456430
Système nerveux central	42547	6,9	32558	4,9	15897	33333	43615
Testicule	18008	7,2	909	0,3	15744	47091	78365
Tous cancers sauf les non-mélanomes	2634582	382,0	1262433	164,6	1893731	4842858	7184205
Vésicule biliaire et voies biliaires	23546	3,0	15979	2,0	8649	17678	22977
Vessie	123135	16,3	40252	4,7	102529	271670	409813

## 2. Statistiques du myélome multiple en Europe



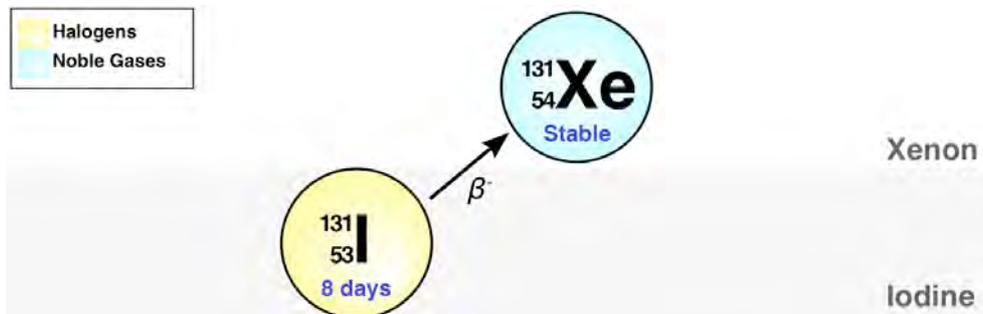
Estimation de l'incidence et de la mortalité : myélome multiple et maladies immunoprolifératives  
chez les deux sexes en 2012

Pays	Incidence		Mortalité		Prévalence		
	Nombre	Taux	Nombre	Taux	1-année	3-année	5-année
Europe	38928	3,8	24283	2,2	28987	66516	89187
Union européenne (27)	33413	4,5	20318	2,5	24865	57167	76751
Albanie	13	0,5	10	0,4	11	26	36
Allemagne	5947	4,3	3780	2,5	4147	9045	11716
Autriche	476	3,8	331	2,4	326	717	942
Bélarus	282	2,6	216	1,9	202	448	595
Belgique	835	5,3	484	2,6	655	1589	2217
Bosnie-Herzégovine	44	0,9	30	0,7	36	84	115
Bulgarie	240	2,4	108	1,0	173	384	507
Chypre	44	3,8	30	2,4	36	88	119
Croatie	229	3,6	140	2,0	179	425	583
Danemark	311	4,0	241	2,8	233	508	654
Espagne	2420	3,5	1675	2,2	1830	4258	5730
Estonie	70	3,9	50	2,5	48	108	145
Finlande	358	4,2	274	3,0	272	619	816
France	6022	6,6	2764	2,6	4872	11711	16088
Grèce	567	2,9	380	1,9	435	1024	1400
Hongrie	257	1,8	203	1,4	181	403	535
Irlande	294	6,1	159	3,1	193	423	554
Islande	17	4,8	11	2,6	14	44	64
Italie	5362	5,5	3194	2,8	4154	10017	13906
Lettonie	82	2,7	73	2,2	58	127	167
Lituanie	187	4,3	116	2,6	131	286	374
Luxembourg	24	3,6	15	2,1	23	63	85
Macédoine	21	0,9	18	0,8	16	41	57
Malte	19	3,2	13	2,2	14	34	45
Moldavie	53	1,5	36	1,0	38	85	112
Monténégro	12	1,8	9	1,4	12	28	37
Norvège	456	7,0	254	3,5	357	828	1112
Pays-Bas	1201	5,2	641	2,6	922	2108	2800
Pologne	1421	3,0	1215	2,4	1035	2198	2818
Portugal	513	3,3	365	2,1	344	811	1128
République Tchèque	426	3,0	328	2,2	289	616	785
Roumanie	644	2,5	344	1,3	451	1019	1356
Royaume-Uni	4650	5,2	2799	2,9	3229	7126	9348
Russie	2738	1,7	2180	1,3	1977	4410	5822
Serbie	292	2,5	241	2,0	238	562	767
Slovaquie	284	4,5	127	2,0	203	452	596
Slovénie	134	4,7	102	3,1	99	225	303
Suède	625	4,4	507	3,1	512	1208	1617
Suisse	578	5,2	335	2,7	470	1080	1430
Ukraine	780	1,5	485	0,9	572	1288	1706

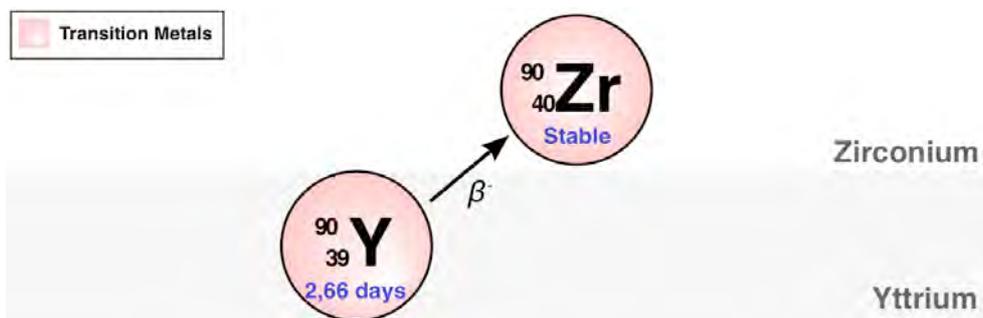
### 3. Schémas de désintégrations nucléaires

#### 3.1. Émetteurs $\beta^-$

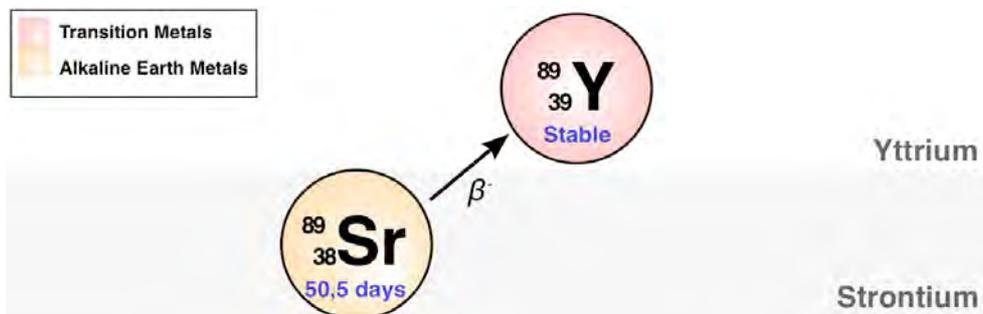
Iode-131



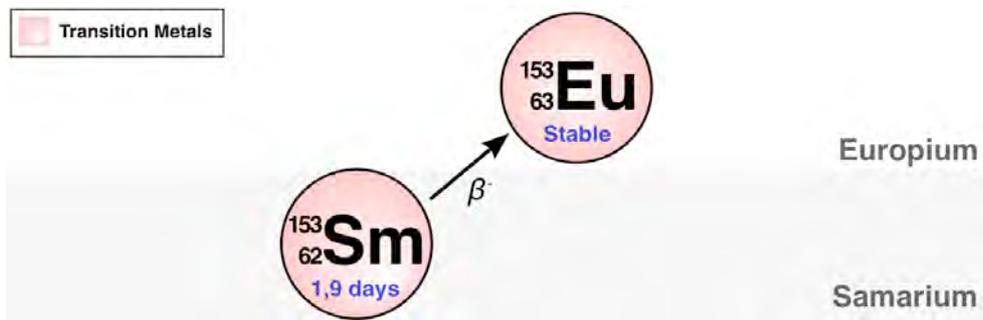
Yttrium-90



Strontium-89

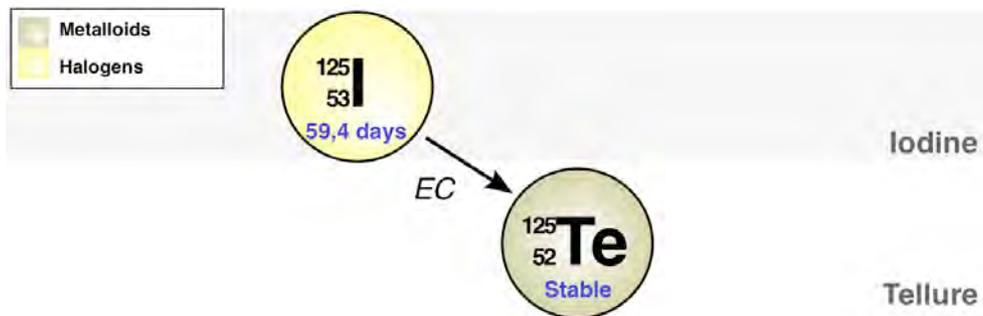


## Samarium-153



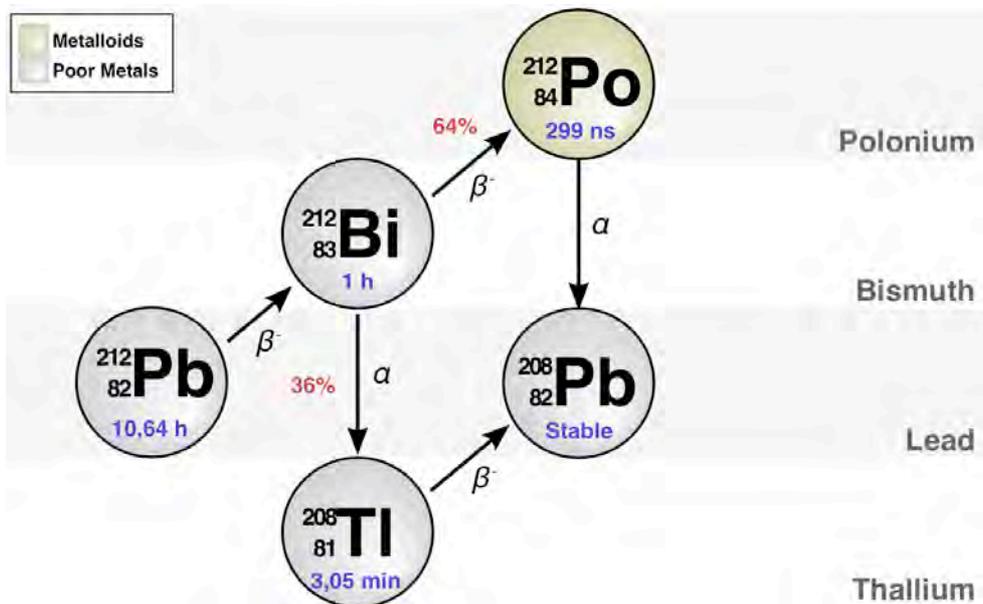
## 3.2. Émetteurs Auger

### Iode-125

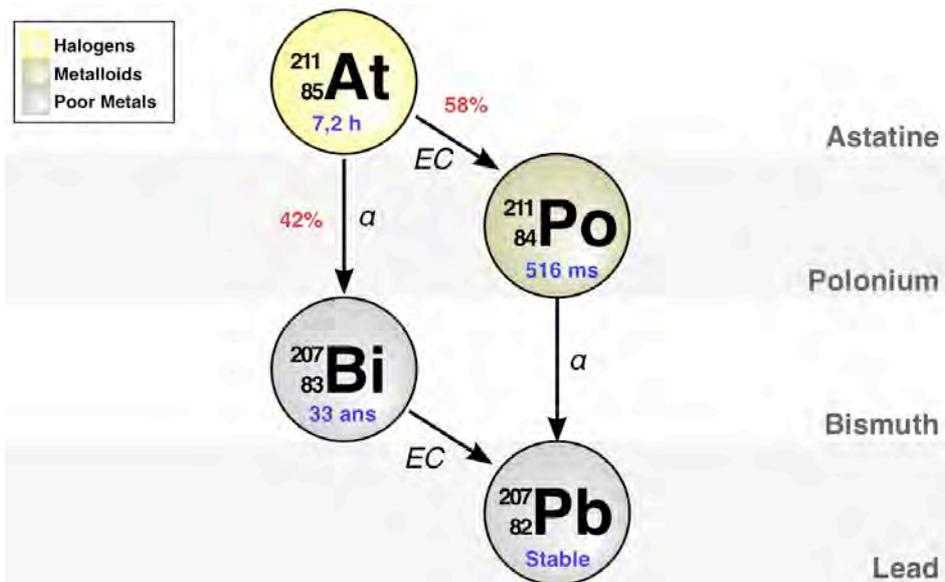


## 3.3. Émetteurs $\alpha$

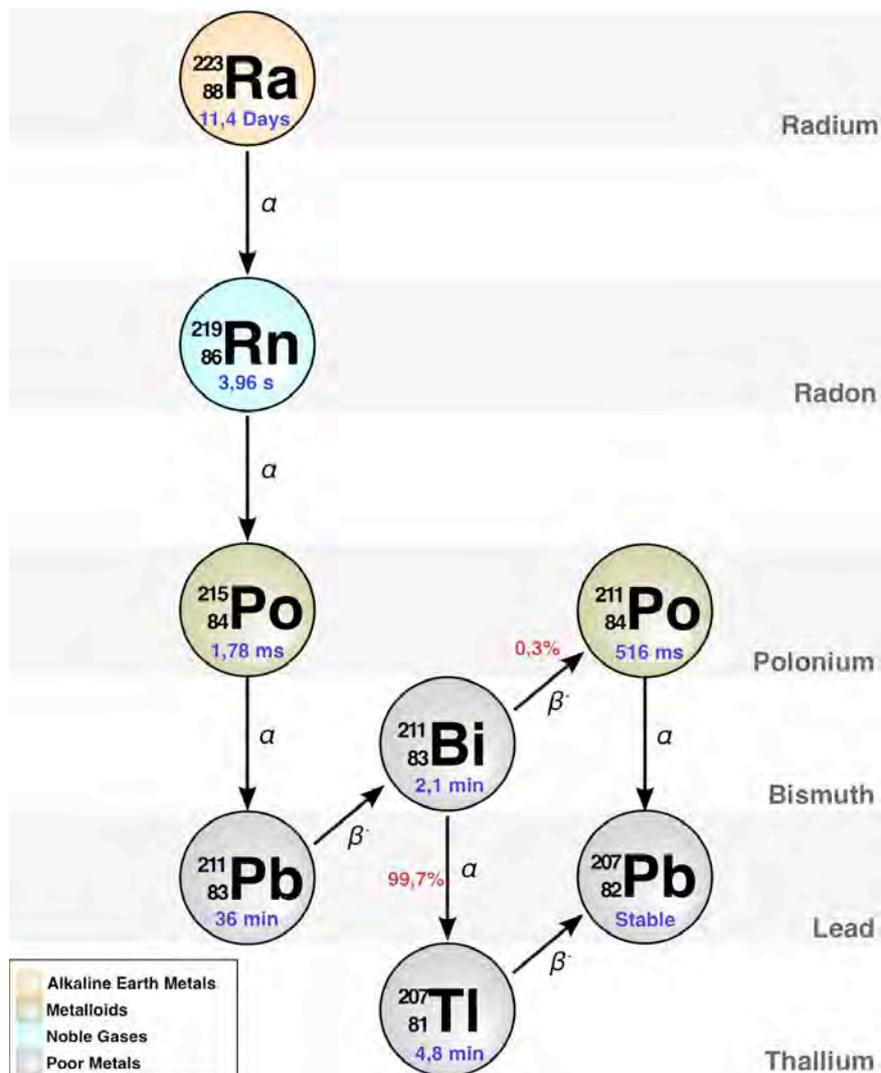
### Plomb-212/Bismuth-212



## Astate-211



## Radium-223



## 4. Détail des émissions $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$ du $^{213}\text{Bi}$ et configuration électronique

### 4.1. Détails des émissions liées à la désintégration du $^{213}\text{Bi}$

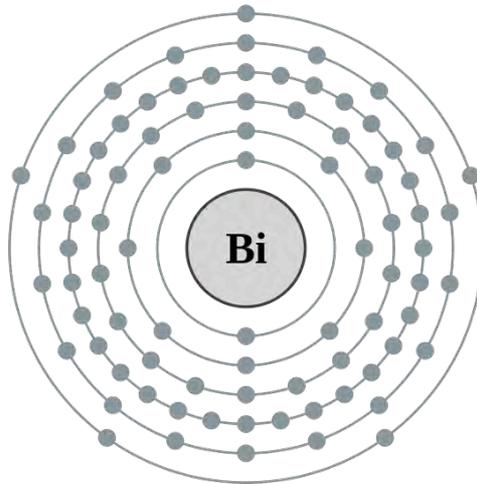
Isotope	Alpha-particles					
	Energy	Isotope %	Effective %	Mean energy	$\Delta_\alpha$	Alpha range
	(keV)	per disint.	per disint.	(keV/disint.)	(Gy kg/Bq s)	( $\mu\text{m}$ )
Bi-213	5549	0.16	0.16	8.88	1.42E-15	42.0
Bi-213	5869	2.01	2.01	117.97	1.89E-14	45.5
Po-213	7614	0.003	0.003	0.22	3.58E-17	66.0
Po-213	8375	100.00	97.80	8190.75	1.31E-12	75.6
Sum				8317.82	1.33E-12	

Isotope	Electrons					
	Energy	Isotope %	Effective %	Mean energy	$\Delta_e$	Elec. range
	(keV)	per disint.	per disint.	(keV/disint.)	(Gy kg/Bq s)	(mm)
Bi-213	200	0.20	0.20	0.40	6.41E-17	0.5
Bi-213	347	2.55	2.55	8.85	1.42E-15	1.4
Bi-213	423	0.40	0.40	1.69	2.71E-16	1.9
<b>Bi-213</b> <b>(beta)</b>	<b>444</b>	<b>97.80</b>	<b>97.80</b>	<b>434.23</b>	<b>6.96E-14</b>	2.1
Tl-209 <b>(beta)</b>	659	100.00	2.20	14.50	2.32E-15	4.2
<b>Pb-209</b> <b>(beta)</b>	<b>198</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	<b>198.00</b>	<b>3.17E-14</b>	0.5
Sum				657.67	1.05E-13	

Isotope	Photon energy	S-factor
	(keV)	(Gy/MBq s)
Bi-213	440	5.78E-11
Bi-213	79	9.84E-13
Tl-209	117	1.60E-12
Tl-209	467	6.71E-12
Tl-209	1566	2.37E-11
Sum = $S_{\text{wb} \leftarrow \text{wb}}$		9.08E-11

Tables issues de (Sgouros 2008)

## 4.2. Configuration électronique du bismuth-213



83 Bi bismuth : [Xe] 4f <sup>14</sup> 5d <sup>10</sup> 6s <sup>2</sup> 6p <sup>3</sup>																					
1s <sup>2</sup>	2s <sup>2</sup>	2p <sup>6</sup>	3s <sup>2</sup>	3p <sup>6</sup>	3d <sup>10</sup>	4s <sup>2</sup>	4p <sup>6</sup>	4d <sup>10</sup>	4f <sup>14</sup>	5s <sup>2</sup>	5p <sup>6</sup>	5d <sup>10</sup>	6s <sup>2</sup>	6p <sup>3</sup>							
2	8		18			32				18			5								

(www.wikipedia.com)

## RÉSUMÉ ET MOTS-CLÉS

### Contribution à l'étude de la radiobiologie des émetteurs de particules alpha et de leur impact sur l'immunogénicité des tumeurs

La Radioimmunothérapie (RIT) est une thérapie vectorisée permettant l'irradiation ciblée de cellules tumorales. L'usage des émetteurs  $\alpha$  en RIT semble intéressant car le transfert d'énergie linéique élevé de ces particules et leur parcours limité dans les tissus est adapté au traitement de micrométastases ou de cancers disséminés. De plus, leur efficacité semble indépendante du débit de dose, de l'hypoxie tumorale ou de la distribution des cellules au sein du cycle cellulaire. En parallèle, un nombre croissant d'études montre que les rayonnements ionisants peuvent permettre le développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale par l'induction d'une mort cellulaire immunogène. Jusqu'à présent, peu d'études se sont intéressées aux mécanismes de mort cellulaire après irradiation  $\alpha$  et aucune information n'est disponible sur l'effet des  $\alpha$  sur l'immunité. Nous avons donc choisi d'étudier les mécanismes moléculaires de la réponse cellulaire et l'immunogénicité de cellules tumorales après irradiation par le bismuth-213 ( $^{213}\text{Bi}$ ). Nous avons montré que le  $^{213}\text{Bi}$  induit un blocage du cycle en G2, l'autophagie et la libération de DAMPs. Les cellules tumorales irradiées peuvent également induire l'activation de cellules dendritiques *in vitro*. De plus, la vaccination de souris immunocompétentes avec des cellules tumorales irradiées au  $^{213}\text{Bi}$  induit une protection anti-tumorale dépendante de lymphocytes T. Nos résultats montrent que l'irradiation  $\alpha$  peut stimuler l'immunité adaptative et induire une protection anti-tumorale efficace *in vivo*. Cette étude ouvre de nouvelles perspectives pour le développement de traitements combinatoires utilisant la RIT  $\alpha$  couplée à l'immunothérapie.

Mots-clés : cancer, radiations ionisantes, immunité, émetteurs alpha, radiobiologie, autophagie, mort cellulaire immunogène

### Contribution to the study of alpha particle radiobiology and their effect on tumour immunogenicity

Radioimmunotherapy (RIT) is a therapeutic modality that allows delivering of ionizing radiation (IR) directly to targeted cancer cells. Conventional RIT uses  $\beta$ -emitting radioisotopes, but recently a growing interest has emerged for the clinical development of  $\alpha$  particles. Alpha emitters are ideal for killing isolated or small clusters of tumor cells thanks to their high linear energy transfer and short path in tissue. Their efficacy is also less sensitive to dose rate, tissue oxygenation or cell cycle status. In parallel, growing evidence has shown that IR can foster an anti-tumor immune response through the induction of immunogenic cell death. Several studies have described  $\alpha$  emitter radiobiology but little is known about cell death mechanisms induced after  $\alpha$  radiation and no investigation has been undertaken to analyze the impact of  $\alpha$  particles on the immune response. Therefore, we decided to investigate the molecular mechanisms of cell response and immunogenicity of tumor cells after bismuth-213 ( $^{213}\text{Bi}$ ) irradiation. *In vitro* studies demonstrated that  $^{213}\text{Bi}$  treated cells undergo cell cycle arrest in G2 phase, activate autophagy, release DAMPs and activate dendritic cells. Besides, vaccination of immunocompetent mice with  $^{213}\text{Bi}$  irradiated tumor cells induce a protective anti-tumor response *in vivo* that is mediated by tumor specific T cells. Our results demonstrate that  $\alpha$  irradiation can stimulate adaptive immunity and elicit an efficient anti-tumour protection. Even though the impact of  $\alpha$  radiation on the immune response to cancer will have to be further characterized, this study opens new perspectives for combinatory treatments using  $\alpha$  RIT with immunotherapy.

Keywords: cancer, ionizing radiation, immunity, alpha emitters, radiobiology, autophagy, immunogenic cell death

**Gorin Jean-baptiste**

INSERM U892 / CNRS UMR 6299 - CRCNA

8 quai Moncoussu - BP 70721

44007 Nantes cedex 1