

**UNIVERSITÉ DE NANTES  
FACULTÉ DE MÉDECINE**

**RADIOIMMUNOTHÉRAPIE ALPHA  
DU MYÉLOME MULTIPLE**

**THÈSE DE DOCTORAT**

École doctorale CHIMIE BIOLOGIE  
Discipline BIOLOGIE  
Spécialité RADIOBIOLOGIE

*présentée  
et soutenue publiquement par*

**SUPIOT Stéphane Gilles Marie**

Le 02 novembre 2005, devant le jury ci-dessous

Président :

Rapporteurs :

Mme Elisabeth Cohen-Jonathan Moyal  
M. Christophe Hennequin

Examineurs :

M. François-Régis Bataille  
M. Marc André Mahé

Directeurs de thèse :

M. Michel Chérel  
M. Jean-François Chatal

# Table des matières

1	Introduction.....	7
1.1	La radioimmunothérapie.....	7
1.1.1	La radioimmunothérapie bêta.....	9
1.1.2	La radioimmunothérapie alpha.....	10
1.1.3	Données pré-cliniques.....	14
1.1.4	Comparaison de la RIT alpha avec la RIT bêta.....	17
1.2	Effets biologiques des rayonnements alpha.....	20
1.2.1	Dépôt d'énergie à l'intérieur des cellules après irradiation alpha.....	20
1.2.2	Effets biochimiques.....	22
1.2.3	Effets cellulaires de la radioimmunothérapie alpha.....	28
1.2.4	Influence du faible débit de dose.....	31
1.3	Le Myélome multiple.....	33
1.3.1	Données médicales.....	33
1.3.2	Antigènes présents à la surface des cellules de myélome.....	35
1.3.3	Place des rayonnements ionisants dans le traitement du myélome multiple....	36
2	Objectifs du travail de thèse.....	38
3	Matériel et méthode.....	40
3.1	Lignées cellulaires et culture.....	40
3.2	Anticorps.....	40
3.2.1	Caractéristiques des anticorps.....	40
3.2.2	Digestion des anticorps.....	41
3.2.3	Couplage avec un agent chélatant.....	41
3.3	Irradiation.....	41
3.3.1	Radioimmunothérapie alpha.....	42
3.3.2	Irradiation externe au <sup>60</sup> Co.....	42
3.3.3	Radiomarquage à l'iode 131, émetteur bêta.....	43
3.4	Chimiothérapies.....	43
3.4.1	protocoles d'administration.....	43
3.4.2	chimiothérapies.....	43
3.5	Mesures expérimentales cellulaires.....	44
3.5.1	Mesure de la prolifération cellulaire par incorporation de thymidine tritiée....	44
3.5.2	Quantification de la synergie, de l'additivité ou de l'antagonisme par la méthode de Chou-Talalay.....	44
3.5.3	Mesure de la survie clonogénique par dilution limite.....	45
3.5.4	Mesure de l'apoptose.....	45
3.5.5	Analyse du cycle cellulaire.....	45
3.5.6	Mesure de l'internalisation de l'anticorps B-B4.....	46
3.6	Analyses par méthodes biochimiques.....	46
3.6.1	Analyse de l'expression protéique par western blot.....	46
3.7	Biologie moléculaire.....	48

3.7.1	Techniques.....	48
3.7.2	clonage et transfection des plasmides pEGFp-C3- K-Ras .....	53
3.8	Méthodes statistiques.....	57
3.9	Étude dosimétrique .....	58
4	Résultats.....	59
4.1	Anticorps et radioélément .....	59
4.1.1	Choix de l'anticorps .....	59
4.1.2	Comparaison de la RIT alpha avec la RIT bêta.....	67
4.1.3	Effets biologiques de l'anticorps B-B4 marqué au bismuth 213 sur différentes lignées cellulaires .....	70
4.1.4	Dosimétrie alpha Comparaison avec une irradiation gamma.....	75
4.1.5	Bilan .....	80
4.2	Effets de la RIT alpha combinée avec différentes chimiothérapies .....	81
4.2.1	Prolifération des cellules traitées par chimiothérapie seule .....	81
4.2.2	Combinaison .....	83
4.2.3	Mécanismes de l'effet synergique de la RIT alpha avec le paclitaxel ou la doxorubicine.....	92
4.2.4	Association de la RIT alpha avec la gemcitabine .....	98
4.2.5	Bilan .....	102
4.3	Résultats préliminaires concernant l'étude de la transduction du signal après irradiation.....	103
4.3.1	Réponse à une irradiation gamma.....	104
4.3.2	Voies de signalisation induites par une irradiation alpha.....	108
4.3.3	Influence de K-RAS 4B sur la prolifération cellulaire de la lignée U266 après irradiation.....	112
5	Discussion.....	114
5.1	Comparaison des anticorps B-B4 et MA5 .....	115
5.2	Comparaison RIT alpha et RIT bêta.....	116
5.3	Efficacité biologique relative de la RIT alpha et notion de radiorésistance à l'irradiation alpha .....	117
5.4	Effets synergiques de la RIT alpha avec le paclitaxel et la doxorubicine.....	119
5.5	Mécanismes de l'effet synergique de la RIT alpha avec la doxorubicine ou le paclitaxel.....	121
5.6	Combinaison RIT alpha et gemcitabine.....	124
5.7	Voies de transductions du signal : résultats préliminaires .....	127
6	Conclusion et perspectives.....	132
7	Liste des Abréviations .....	137

8	Documents scientifiques élaborés à partir de ce travail de thèse .....	139
8.1	Article 1.....	139
8.2	Article 2.....	140
8.3	Article 3.....	141
8.4	Article 4.....	142
8.5	Article 5.....	143
8.6	Protocole de phase I de radioimmunothérapie bêta du myélome multiple à l'aide de l'anticorps B-B4 marqué à l'iode 131 .....	144
9	Liste des tableaux .....	145
10	Liste des figures.....	146
11	Bibliographie.....	149

# 1 Introduction

Ce travail de thèse aborde une discipline en pleine évolution au sein de la cancérologie, la radioimmunothérapie. Issue de la médecine nucléaire et intégrée pleinement dans l'arsenal des thérapeutiques anti-cancéreuses hautement ciblées, la radioimmunothérapie s'impose actuellement comme traitement de référence des lymphomes non hodgkiniens. Le laboratoire du Pr. Jean-François Chatal et du Dr Jacques Barbet s'est attaché depuis plus de 20 ans à développer les multiples aspects de cette thématique, depuis la production d'anticorps, la chélation des radioéléments, le ciblage *in vitro* et *in vivo* pour aboutir à des études cliniques. Une collaboration avec l'institut des transuraniens de Karlsruhe a permis de développer l'étude de la radioimmunothérapie utilisant des radioéléments émetteurs alpha, tout comme une poignée d'autres équipes à travers le monde. Le travail de thèse qui nous a été confié par le Dr Chérel et le Pr. Chatal avait pour objectif de mieux comprendre afin d'exploiter les possibilités novatrices de cet outil thérapeutique qu'est la radioimmunothérapie alpha dans un modèle original, le myélome multiple. Avant de décrire plus en détail les étapes du questionnement ayant conduit ces travaux, il est nécessaire d'aborder les multiples aspects relatifs à ce domaine particulier de la cancérologie : ce qu'est la radioimmunothérapie, les mécanismes qui sont impliqués dans la réponse à ce type particulier d'irradiation et ce que représenterait la place de la radioimmunothérapie dans la prise en charge du myélome multiple.

## 1.1 La radioimmunothérapie

La radioimmunothérapie (RIT) est une thérapeutique anti-cancéreuse de radiothérapie interne combinant un anticorps et un radioélément. La RIT utilisant des émetteurs bêta a été développée en cancérologie pour le traitement de tumeurs de petite taille ou au stade de maladie résiduelle, mais elle a surtout montré son efficacité en hématologie dans le traitement des lymphomes non hodgkiniens<sup>1-3</sup>. Les anticorps utilisés dans la radioimmunothérapie peuvent être utilisés sous la forme d'une immunoglobuline entière, ou sous la forme de fragments (Fab<sub>2</sub>, scFv, diabody...).

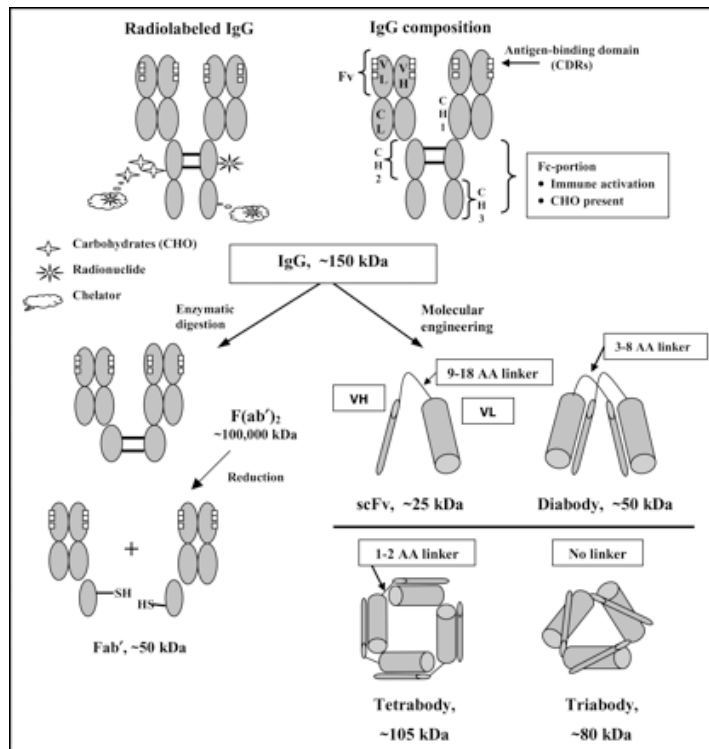


Figure 1 : représentation schématique des différentes formes de fragments d'anticorps préparés par digestion enzymatique ou ingénierie moléculaire.

La forme IgG, la plus utilisée, peut être radiomarquée directement sur la protéine (ex : halogénéation sur la tyrosine) ou via un agent chélatant. Ces agents chélatants peuvent être couplés directement sur la protéine ou sur les hydrates de carbone de la portion Fc de la molécule. Les fragments scFV sont formés d'une chaîne variable légère (VL) et d'une chaîne variable lourde (VH) avec un lien formé d'acides aminés. Les diabodies, triabodies et tétrabodies se forment spontanément quand des chaînes d'acides aminés servent de liens pour unir les unités VH et VL. Les anticorps recombinants bispécifiques peuvent être préparés en assemblant les parties VH et VL de 2 anticorps avec une spécificité différente. (d'après Sharkey<sup>4</sup>)

Ces anticorps sont pour la plupart d'origine animale, et peuvent être modifiés de façon à diminuer la proportion de déterminants antigéniques animaux et les remplacer par des antigènes humains (chimérisation et humanisation). Les anticorps peuvent être monospécifiques, ou reconnaître plusieurs antigènes. D'autres vecteurs que des anticorps peuvent être utilisés pour cibler les cellules tumorales, comme des peptides, des toxines, des ADN anti-sens...<sup>5</sup>. Les cibles antigéniques sont situées sur les cellules tumorales ou leur microenvironnement. La RIT permet de placer une source radioactive directement au contact du tissu ciblé. Trois types de sources radioactives sont employées : émetteurs de particules bêta, émetteurs de particules alpha et émetteurs d'électron Auger. Ce dernier type d'émetteur ne sera pas développé dans ce travail de thèse.

### 1.1.1 La radioimmunothérapie bêta

Chez l'homme, l'efficacité de la RIT  $\beta$  (iode 131 et yttrium 90) a tout d'abord été démontrée pour les affections hématologiques malignes notamment les lymphomes malins non hodgkiniens. Les premiers essais de RIT avec de l'iode 131 ont été conduits dans les années 1990, chez des patients porteurs de lymphomes non hodgkiniens réfractaires ou résistants, avec différents anticorps monoclonaux (AcM) dirigés contre un déterminant antigénique de lymphocytes tumoraux B : AcM Lym-1-<sup>131</sup>I<sup>6</sup>, AcM anti-CD37<sup>7</sup> et AcM anti-CD20<sup>1</sup>. Par la suite, l'AcM anti-CD20-<sup>131</sup>I a été commercialisé (<sup>131</sup>I-tositumomab, Bexxar<sup>®</sup>) et dans les mêmes indications, a permis d'obtenir des taux de réponses supérieurs à 70 %<sup>8</sup>. Des anticorps anti-CD20 marqués à l'yttrium 90 sont en cours d'évaluation (Zevalin<sup>®</sup>, AcM murin anti-CD20-<sup>90</sup>Y et l'IMMU-LL2-<sup>90</sup>Y, AcM humanisé anti-CD20-<sup>90</sup>Y), concernant les récurrences de lymphomes de haut grade mais également en première ligne, en consolidation du traitement de référence<sup>9,10</sup>. Pour les tumeurs solides, l'intérêt de la RIT  $\beta$  reste à démontrer, avec des résultats plus contradictoires et moins encourageants<sup>11-14</sup>. Ces résultats s'expliquent en partie par l'importance des masses tumorales traitées et par le ciblage en un temps, ne permettant pas de délivrer une dose tumoricide avec une irradiation acceptable des tissus sains. Des résultats plus encourageants ont été rapportés dans la maladie résiduelle microscopique des adénocarcinomes ovariens<sup>15,16</sup> ainsi que dans le cancer médullaire de la thyroïde avec une RIT  $\beta$  en deux temps (système AES pour Affinity Enhancement System)<sup>17-19</sup>. Ce système AES associe un anticorps bispécifique (AcBs), anti-antigène tumoral-antihaptène, et un haptène bivalent radio-marqué de PM inférieur à 1000. La bivalence du haptène permet la liaison avec les AcBs prélocalisés à la surface des cellules tumorales, en tirant partie de la forte affinité entre l'AcBs et le haptène dans la tumeur comparée à une affinité modeste dans la circulation et les tissus normaux<sup>4</sup>.

## **1.1.2 La radioimmunothérapie alpha**

En 1926, Claudius Regaud et Antoine Lacassagne avait prédit que « l'agent idéal du traitement du cancer serait constitué d'éléments lourds, capable d'émettre des rayonnements d'ordre moléculaire, qui serait administré dans l'organisme et se fixerait dans le protoplasme des cellules que l'on cherche à détruire »<sup>20</sup> cité par<sup>5</sup>. Cette définition caractérise parfaitement la radioimmunothérapie alpha qui combine un radioélément émetteur alpha avec un anticorps.

### **1.1.2.1 Généralités**

Les particules alpha sont des noyaux d'hélium 4. Il existe approximativement une centaine de radioéléments émetteurs alpha, pour la plupart des noyaux lourds de numéro atomique supérieur à 82, et seul un nombre réduit est disponible pour une utilisation clinique éventuelle (pour revue<sup>21,22</sup>).

Différents critères s'imposent dans la sélection de ces radioéléments. Le premier critère concerne avant tout la disponibilité commerciale du radioélément. La majorité de ces radioéléments proviennent de réacteurs nucléaires, et seuls quelques-uns sont produits à l'aide de cyclotron. Un deuxième critère prend en compte les processus chimiques nécessaires à leur couplage à l'anticorps. Par exemple, dans le cas de radioéléments à demi-vie courte (comme le bismuth 213), la durée de l'éluion et des processus de purification doit être suffisamment courte pour obtenir une activité utilisable suffisante, tout en garantissant une bonne pureté et qualité radiochimique. Un troisième critère de sélection des émetteurs alpha doit prendre en compte le devenir du radioélément dans les tissus biologiques, puisqu'il a été montré par exemple que l'astate était relargué plus rapidement hors de la cellule que le bismuth<sup>23</sup>. Enfin, un dernier critère de choix du radioélément tient compte des noyaux fils, qui peuvent suivre des voies d'élimination différentes des noyaux parents. Ceci prend d'autant plus d'importance dans le cas où les noyaux fils présentent une période physique longue.



### **1.1.2.2 Émetteurs disponibles**

À l'heure actuelle, la littérature internationale reste encore pauvre concernant la RIT alpha, très probablement en raison de l'absence ou de la non-disponibilité d'isotopes appropriés et de leur coût.

#### **1.1.2.2.1 Bismuth 212**

Parmi les radioéléments utilisables pour des études précliniques (Tableau 1), le bismuth 212 a fait l'objet des premières études animales qui ont conduit au développement de la RIT alpha<sup>24</sup>. Son utilisation reste toutefois limitée par l'émission d'un rayonnement gamma fortement énergétique qui nécessite des mesures de radioprotection importantes, ainsi que la libération du radon 220, gaz radioactif obligeant à réaliser les expérimentations sous atmosphère contrôlée. Ce même problème de désintégration en radon limite l'utilisation potentielle du radium 223. Le plomb 212 présente une demi-vie intéressante, mais la production d'électrons Auger et d'électrons de capture peuvent déstabiliser la structure chimique du vecteur et du ligand.

#### **1.1.2.2.2 Bismuth 213**

Le radioélément le plus étudié à l'heure actuelle demeure le bismuth 213 (Figure 2), principalement en raison de sa disponibilité (production d'un générateur d'actinium 225 en Allemagne au sein de l'institut des transuraniens de Karlsruhe) et de la possibilité d'une chélation stable par le CHX-A''-DTPA<sup>25</sup>. Son utilisation a abouti à la seule étude clinique ayant démontré la faisabilité de la RIT alpha chez l'homme<sup>26</sup>. Son utilisation est toutefois limitée par sa demi-vie de 45 minutes, puisque la désintégration du bismuth 213 libère 20% de son énergie pendant les 15 premières minutes, et 3 heures après injection, il persiste seulement 6% de son énergie. Ceci rend son utilisation d'un maniement périlleux lors des expérimentations *in vitro* et *in vivo*, et oblige à réaliser l'ensemble des expérimentations sur la période de 2 semaines où le générateur d'actinium 225 présente une activité suffisante.

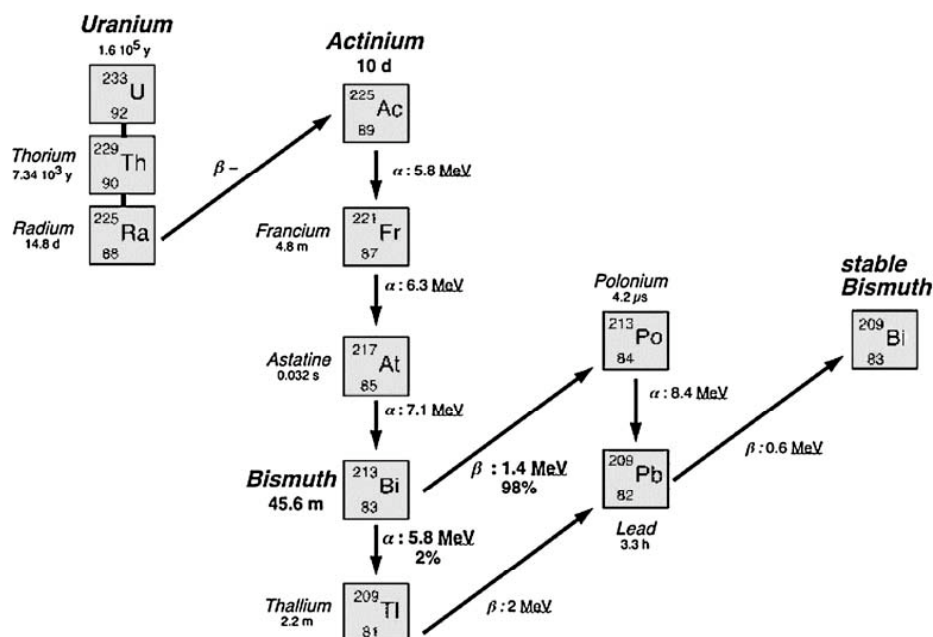


Figure 2 : Schéma de décroissance de l'uranium 233 (d'après Couturier<sup>21</sup>)

### 1.1.2.2.3 Astate 211

L'astate 211 représente une alternative intéressante, avec une demi-vie plus longue et une fixation directe sur l'anticorps ne nécessitant pas systématiquement une chélation. Des études cliniques sont en cours, et notre laboratoire prévoit de disposer de ce radioélément prochainement avec l'aide d'une collaboration avec le cyclotron d'Orléans, puis dans un deuxième temps par le cyclotron de haute énergie en cours d'installation à Nantes. Son principal inconvénient provient de la libération de l'astate par déhalogénéation au passage de la membrane cytoplasmique qui peut survenir si l'anticorps est internalisé.

### 1.1.2.2.4 Actinium 225

L'actinium 225 aboutit à la production de 5 particules alpha (Figure 2), ce qui a conduit à la réalisation de « nanogénérateur » extrêmement puissant lors de son utilisation pré-clinique<sup>27</sup>. Cette production abondante de particules alpha permettrait d'augmenter l'activité totale injectable aux patients. Le développement de ce radioélément reste toutefois limité par

la disponibilité d'un agent chélatant suffisamment stable dans le sérum, capable de se lier avec chacun des noyaux fils, et capable de résister à l'énergie libérée lors de ces désintégrations. Par contre, une fois que l'anticorps est internalisé, l'actinium 225 et ses noyaux fils demeurent à l'intérieur de la membrane cellulaire.

### 1.1.2.2.5 Terbium 149

Le terbium 149 porte de nombreux espoirs malgré la difficulté de son approvisionnement, essentiellement parce que son parcours (28  $\mu\text{m}$ ) est un de plus faibles des émetteurs alpha, ce qui limiterait l'irradiation non désirée des cellules voisines.

Tableau 1 : principaux radioéléments émetteurs et leurs caractéristiques

Radioélément	Agent chélatant	Demi-vie	Émissions	Mode de production	Énergie alpha (MeV)
Astate 211	Non nécessaire	7,2 h	1 $\alpha$	Cyclotron	6,8
Bismuth 212	CHX-A''-DTPA	60,6 min	1 $\alpha$ , 1 $\beta$ $\gamma$ 2,6 MeV Radon 220	Décroissance thorium 228 Générateur $^{224}\text{Ra}$	6
Actinium 225	HEHA-NCS DOTA	10 j	5 $\alpha$ , 2 $\beta$ 1,42 MeV	Cyclotron Décroissance $^{233}\text{U}$	6-8,38
Bismuth 213	CHX-A''-DTPA	45,6 min	2 $\alpha$ , 2 $\beta$ $\gamma$ 440 keV	Générateur $^{225}\text{Ac}$	6-8,38
Plomb 212	DOTA	10,6 h	$e^-$ Auger $e^-$ capture	Décroissance $^{223}\text{Th}$ Générateur $^{224}\text{Ra}$	7,8
Radium 223		11,4 j	4 $\alpha$ , 2 $\beta$ Radon 219	Générateur $^{227}\text{Ac}$	6-7
Terbium 149		4,11h	1 $\alpha$ $e^+$ $e^-$ capture		4

### 1.1.3 Données pré-cliniques

Malgré des efforts constants depuis environ une vingtaine d'années, les travaux publiés portent essentiellement sur trois isotopes émetteurs de particules alpha sur des modèles animaux (astate 211, bismuth 212 et 213) et sur le bismuth 213 dans une étude chez l'homme. Ces difficultés sont liées non seulement aux contraintes de production, préparation et administration des radioéléments, mais surtout aux difficultés de mises au point d'un ciblage antitumoral spécifique. Ainsi, l'intérêt pour la radioimmunothérapie en général, et pour la RIT alpha en particulier s'est nettement accentué depuis la mise en évidence de preuves cliniques de l'efficacité des anticorps anti-CD20<sup>7</sup> et anti-Her2-neu<sup>28</sup>.

Les premières études *in vitro*<sup>24</sup> ont été encourageantes puis des études pré-cliniques dans des modèles murins de xénogreffes de lymphome humain<sup>29</sup>, d'adénocarcinome colique<sup>30</sup> ou de leucémie<sup>31</sup> ont montré que des anticorps spécifiques marqués au bismuth 212 permettait une prolongation de la survie des animaux traités.

D'un point de vue théorique, la RIT alpha offre l'avantage de cibler la maladie résiduelle ou des micro-métastases. Cette hypothèse a été vérifiée dans un modèle de plasmocytome inoculé chez la souris, puisqu'un traitement par RIT alpha a permis de prolonger la survie des animaux lorsque l'injection du radiopharmaceutique était réalisée avant développement d'une tumeur, alors que lorsque l'injection était réalisée à un stade tumoral visible, aucune efficacité n'était notée<sup>32</sup>. De la même manière, l'efficacité *in vitro* de la RIT alpha était moindre pour des sphéroïdes volumineux en comparaison avec des sphéroïdes plus petits<sup>33,34</sup>. Chez l'animal, l'administration de fortes doses de RIT alpha à l'aide d'anticorps anti-CD45<sup>35</sup> ou anti TCR  $\alpha\beta$ <sup>36</sup> marqués au bismuth 213 ont permis d'obtenir une immunosuppression autorisant une greffe de moelle osseuse. Toutefois, les fortes activités nécessaires à cet objectif (au moins 74 MBq/kg) seraient difficiles à atteindre chez l'homme en raison des difficultés de disponibilité du bismuth 213. L'actinium 225, plus puissant, serait alors préférable au bismuth 213.

### 1.1.3.1 Données cliniques

Le concept de radioimmunothérapie alpha a été validé chez l'homme par la seule étude clinique de phase de RIT alpha de l'équipe du Memorial Sloan Kettering Cancer Center de New-York <sup>26</sup>. Dix-huit patients porteurs d'une leucémie aiguë myéloïde en rechute ou réfractaire aux traitements, ont reçu des injections d'anticorps HuM195 reconnaissant l'antigène CD33, marqué au bismuth 213 par l'intermédiaire du CHX-A''-DTPA. Un ciblage tumoral avait été prouvé auparavant par le même anticorps marqué à l'iode 131. Des doses de 10 à 37 MBq/kg ont été délivrées en 3 à 7 injections systémiques sur 2 à 4 jours, soit des doses totales de 602 à 3515 MBq. Le traitement a été supporté correctement sans toxicité aiguë. Une myélotoxicité caractérisée par une diminution des leucocytes circulants est survenue chez tous les patients et a duré en moyenne 22 jours (12-41). Cinq patients ont présenté des fonctions hépatiques perturbées de façon transitoire. Des scintigraphies réalisées au décours de l'administration du produit ont révélé une captation du radioimmunoconjugué dans le foie, les os, la rate plus de 40 000 fois supérieure à celle des reins ou du reste du corps. En comparaison avec le même anticorps radiomarqué à l'iode 131 ou l'yttrium 90 lors d'une étude précédente, les rapports tissus ciblés / corps entier étaient 1000 à 10 000 fois plus élevés à dose absorbée équivalente. Pour 14 patients sur 18, il a été mis en évidence une réduction dépendant de la dose injectée, de 41% ± 22% de l'envahissement de la moelle osseuse par les clones leucémiques, dans un délai de 7 à 10 jours après injection. Cette étude est fondamentale car elle valide le concept clinique de la radioimmunothérapie alpha dans une situation clinique qui se rapproche de celle du myélome multiple. Cette étude souligne toutefois les difficultés du développement d'une telle stratégie de RIT alpha, puisque plus de 10 ans se sont écoulés entre le début de l'étude et sa publication.

### 1.1.3.2 Développement en cours

En raison de la demi-vie très courte du bismuth 213, le vecteur radioisotopique doit se distribuer rapidement dans la circulation sanguine puis dans les tissus tumoraux. Dans ce but et dans le but de diminuer la dose délivrée aux tissus sains et ainsi augmenter le rapport tumeur/tissu sain, des méthodes de radioimmunothérapie avec pré-ciblage ont été développées. Plusieurs méthodes sont disponibles, que ce soit le système « Affinity Enhancement System » (AES) développé au sein de notre équipe<sup>17-19</sup>, ou un système de préciblage par avidine biotin<sup>37</sup>. Cette dernière approche a été appliquée avec succès dans un modèle de leucémie T exprimant le CD25<sup>38</sup>, puisque l'efficacité du traitement en deux temps était supérieur à la RIT bêta<sup>38</sup>, ou à la RIT alpha en un temps<sup>39</sup>.

Une autre stratégie destinée à accélérer la fixation de l'anticorps sur sa cible a utilisé des fragments d'anticorps scFV dont la répartition dans l'organisme est plus rapide que l'anticorps entier ou sous la forme Fab'<sup>240</sup>.

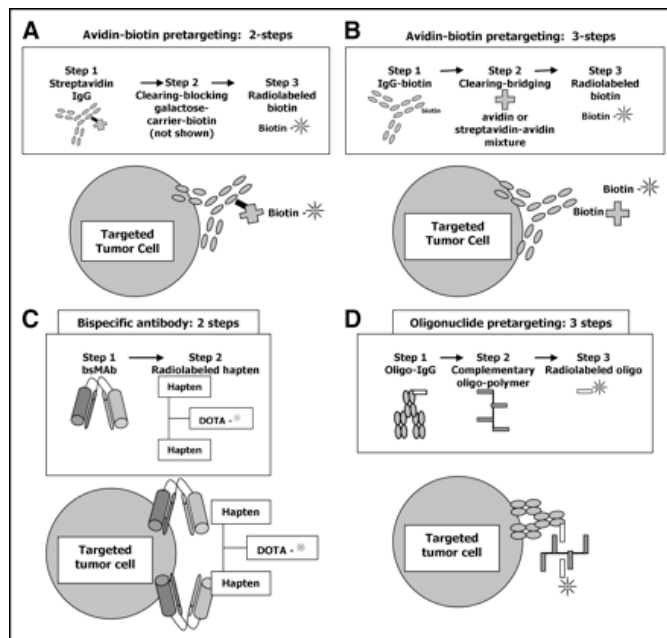


Figure 3 : Exemples d'approches de pré-ciblage (A) en deux-temps par avidine-biotine (B) en trois temps par avidine-biotine (C) à l'aide de préciblage par un anticorps bispécifique (D) à l'aide de préciblage par oligonucléotides (D'après Sharkey<sup>4</sup>).

### 1.1.4 Comparaison de la RIT alpha avec la RIT bêta

La RIT alpha représente une approche comparable à la RIT bêta, mais de nombreuses spécificités physiques les séparent. Premièrement, les particules alpha ont un parcours moyen de 50 à 100  $\mu\text{m}$  dans les tissus biologiques, alors que le parcours des émissions bêta est de l'ordre de quelques millimètres, ce qui permet de limiter l'irradiation non désirée des tissus environnants (Tableau 2). Deuxièmement, la désintégration alpha permet de délivrer une plus grande quantité d'énergie dans un volume plus réduit, ce qui confère à l'irradiation alpha une plus grande cytotoxicité à nombre de désintégrations équivalent. L'énergie des particules alpha est de l'ordre de plusieurs MeV, et le transfert d'énergie linéique (TEL) a été mesuré de 20 à plusieurs centaines  $\text{keV}/\mu\text{m}$ , alors qu'il n'est que de 0,2  $\text{keV}/\text{mm}$  pour les particules bêta. Ceci permet de délivrer une dose importante et ainsi créer un grand nombre d'ionisation dans un volume réduit de l'ordre de quelques diamètres cellulaires. L'Efficacité Biologique Relative (EBR) d'un type de rayonnement donné se réfère à la dose équivalente, habituellement rayons X, qui produit le même effet biologique que le type de rayonnement étudié. À titre de comparaison, pour une dose équivalente, l'EBR des particules alpha est de l'ordre de 5 à 100 en comparaison avec les particules bêta, selon le type d'effet que l'on considère<sup>41</sup>. Ce parcours limité et ce fort dépôt d'énergie laissent espérer un ciblage cellulaire beaucoup plus précis et destructeur dans le cas de la RIT alpha que dans le cas de la RIT bêta. Cette grande capacité de destruction rend les particules alpha particulièrement intéressantes dans le traitement de tumeurs radiorésistantes, telles les glioblastomes<sup>42</sup>.

Tableau 2 : Comparaison entre l'astate 211 émetteurs alpha et l'yttrium 90 émetteur bêta

	<sup>211</sup> At émetteur $\alpha$	<sup>90</sup> Y émetteur $\beta$
Énergie moyenne	6767 keV	935 keV
Parcours moyen	67,5 $\mu\text{m}$	3961 $\mu\text{m}$
TEL moyen	100 $\text{keV}/\mu\text{m}$	0,24 $\text{keV}/\mu\text{m}$

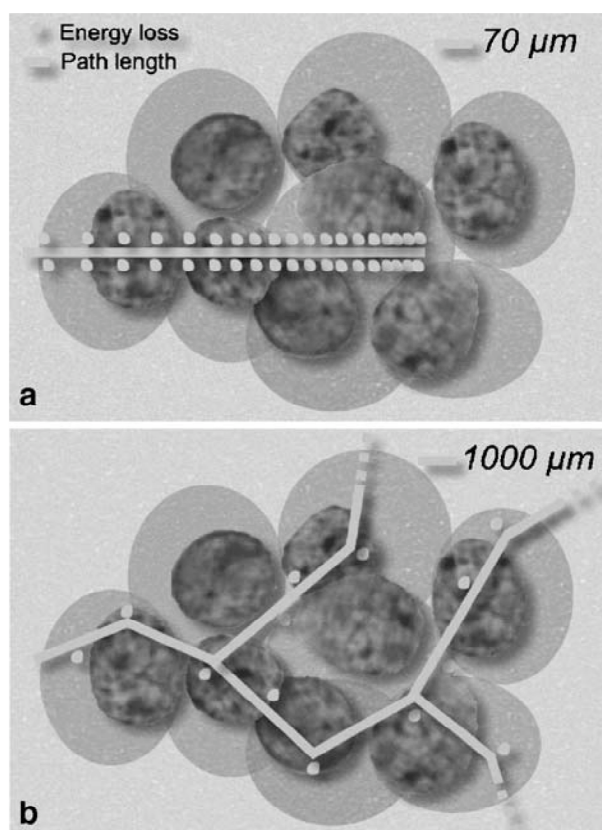


Figure 4 : a - parcours des particules alpha, de l'ordre de quelques diamètres cellulaires comparé avec b - parcours des particules bêta de l'ordre du millimètre (d'après Couturier<sup>21</sup>)

Un troisième point de différence avec la RIT bêta concerne l'approche dosimétrique. Puisque seulement quelques particules alpha traversent la cellule tumorale, une approche micro-dosimétrique doit être considérée. Dans un modèle micro-dosimétrique, la désintégration d'une seule particule alpha émise par l'astate 211 sur la surface d'une cellule a permis d'obtenir le même degré de destruction cellulaire que 1000 désintégration d'yttrium 90, émetteur bêta<sup>43</sup>.

Les quelques études qui ont comparé RIT alpha et RIT bêta à dose équivalente dans les mêmes modèles animaux ont retrouvé une plus grande efficacité de la RIT alpha, que ce soit dans des modèles de carcinose péritonéale de cancers de l'ovaire<sup>44</sup> ou de xénogreffes d'adénocarcinome colique<sup>45</sup>.



Ainsi, d'un point de vue théorique, la RIT alpha offre un grand avantage pour cibler la maladie résiduelle ou des micro-métastases, ou des tumeurs radiorésistantes. D'un point de vue théorique, la RIT bêta semble adaptée à des lésions de plusieurs millimètres, en détruisant par « feu croisé » des cellules proches mais non ciblées par le vecteur radiopharmaceutique.

En pratique, le choix du type de radioélément pour une application RIT dépend de nombreux facteurs tels que :

L'expression antigénique. Si cette expression est restreinte à certaines cellules tumorales, le feu croisé de l'irradiation non spécifique des émetteurs de particules  $\beta$  représente un avantage en comparaison avec les frappes ciblées de la RIT alpha.

La taille de la tumeur ciblée. Plus la taille de la micrométastase sera petite, plus l'avantage théorique des particules  $\alpha$  par rapport aux particules  $\beta$  sera grand.

La disponibilité et le coût du radioélément.

Les propriétés du schéma de décroissance du radioélément et des éléments de filiation.

La période physique suffisamment longue par rapport au délai de fixation du vecteur sur la tumeur.

Un marquage fiable et stable du radioélément sur l'anticorps, sans modification des propriétés immunologiques de l'anticorps.

## **1.2 Effets biologiques des rayonnements alpha**

Les effets d'une irradiation externe, que ce soit par photons X ou gamma, ou que ce soit par particules alpha sont un domaine de recherche déjà exploré. La radioimmunothérapie représente un modèle d'irradiation à un débit de dose exponentiellement décroissant qui présente des différences notables avec une irradiation à haut débit de dose. Peu d'information est disponible concernant une irradiation alpha à faible débit de dose, telle que la radioimmunothérapie alpha. Il nous a donc semblé opportun de mieux déterminer les caractéristiques cellulaires et biochimiques des effets de la RIT alpha. Pour mieux comprendre les particularités de la RIT alpha, nous allons avant tout détailler les mécanismes d'action d'une irradiation depuis le dépôt d'énergie jusqu'aux effets cellulaires, en précisant ensuite les particularités liées à la fois à l'influence du haut transfert d'énergie linéique et à l'influence du débit de dose sur ces effets.

### **1.2.1 Dépôt d'énergie à l'intérieur des cellules après irradiation alpha**

Les rayonnements alpha sont des particules directement ionisantes qui déposent leur énergie progressivement le long de leur trajectoire jusqu'à un arrêt de la particule alpha.<sup>46</sup> Ils déplacent les électrons rencontrés sur leur trajectoire par interactions de type coulombien ce qui conduit à des ionisations et des excitations d'électrons qui représentent l'essentiel du dépôt d'énergie. Comme le poids de la particule alpha est très élevé en comparaison avec le poids d'un électron, sa trajectoire n'est pas défléchie et suit une trace quasiment linéaire sur une courte distance (Figure 5).

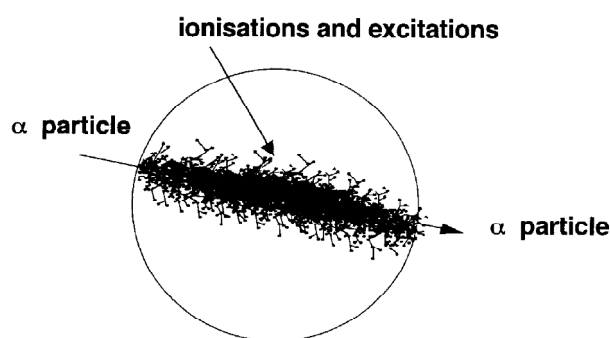


Figure 5 : Représentation schématique de la trace d'une particule alpha (d'après Pouget<sup>47</sup>)

En raison des hautes énergies des particules alpha délivrées sur un parcours très bref, la dosimétrie conventionnelle qui estime la dose moyenne absorbée dans le volume d'une région d'intérêt n'est peut-être pas la méthode la plus pertinente. En raison de ses propriétés physiques, les cellules ciblées peuvent recevoir des doses très élevées alors que les cellules adjacentes peuvent ne pas être irradiées. Pour ces raisons, une approche micro-dosimétrique qui s'intéresse à la distribution spatiale de l'irradiation dans le type cellulaire considéré semblent nécessaires pour estimer la dose délivrées aux cellules tumorales et à leur environnement. De nombreux types de distribution ont été modélisés de façon à déterminer la probabilité qu'une irradiation touche le noyau et l'énergie spécifique moyenne de chaque coup<sup>48,49</sup>.

Ces ionisations aboutissent à la production de radicaux libres qui modifient directement ou indirectement via la productions oxygénés, les molécules formant une cellule. À la différence des radicaux libres formé par production endogène, ceux formés après irradiation sont concentrés dans des « clusters » d'ionisations de l'ordre du nanomètre. Mais les effets délétères des rayonnements ionisants ne peuvent pas être seulement expliqués par la génération immédiate de radicaux libres, puisque le nombre de ceux-ci est trop bas par rapport à ceux produits par le métabolisme cellulaire. Des mécanismes d'amplification de la production de ces radicaux libres sont activés et il est montré que l'irradiation individuelle de cellules au niveau du cytoplasme peut entraîner des mutations de l'ADN<sup>50</sup> et que 15 minutes après irradiation alpha, des élévation retardées de la production d'espèces radicalaires sont encore observées<sup>51</sup>.

## **1.2.2 Effets biochimiques**

### **1.2.2.1 Effets sur l'ADN d'une irradiation alpha**

Ces radicaux libres réagissent avec l'ensemble des constituants d'une cellule, et de nombreuses études ont souligné l'importance des lésions de l'ADN comme cible privilégiée des rayonnements ionisants (pour revue <sup>52</sup>). En effet, des observations initiales ont montré qu'une irradiation alpha de 250 Gy du cytoplasme entraînait le même effet que la même irradiation à la dose de 1 Gy sur le noyau<sup>53</sup>. Le nombre et la distribution de cassures double brins de l'ADN est corrélé avec la survie cellulaire<sup>54</sup>. Une irradiation de haut TEL telle une irradiation alpha provoque des cassures de l'ADN plus complexes et réparées plus lentement qu'une irradiation de faible TEL<sup>55-57</sup>. Plus récemment, il a été montré que les irradiations de haut TEL provoquaient un grand nombre de « locally multiply damaged site » (LMDS) <sup>58</sup> témoignant de lésions de différents types mais focalisées en un point de l'ADN cellulaire, et ainsi plus difficilement réparables<sup>55</sup>. Le taux maximal de cassures double brin survient pour des TEL de 100 keV/μm, puisque la distance entre chaque ionisation induite par l'irradiation s'approche du diamètre de la double hélice de l'ADN (2 nm)<sup>41</sup>. De plus, les particules de haut TEL génèrent plus de lésions chromosomiques que les particules de bas TEL<sup>57</sup>.

### **1.2.2.2 Effets sur les membranes cellulaires**

La principale cible des rayonnements ionisants est l'ADN, mais les rayonnements ionisants engendrent aussi des lésions des membranes et des organelles intracellulaires. La membrane cellulaire est impliquée dans la réponse aux rayonnements ionisants par l'activation de multiples voies de signalisation contrôlant la survie et la prolifération<sup>59,60</sup>. Dans certains types cellulaires, l'irradiation entraîne une élévation dans la production de céramides intracellulaires en raison de lésions membranaires qui causent une hydrolyse de la sphingomyéline. Les voies d'activation liées au céramides, comme la voie des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) sont alors activées pour entraîner la mort cellulaire par apoptose<sup>61-65</sup>.

Au cœur de ce réseau de cascades moléculaires activées après une irradiation, la voie de la famille RAS occupe une place majeure. Afin de mieux comprendre la réponse apoptotique et la survie clonogénique des lignées de myélome irradiées par RIT alpha, nous avons choisi d'analyser les modifications de la transduction du signal après RIT alpha, en nous focalisant particulièrement sur les protéines de la voie de RAS.

### **1.2.2.2.1 La protéine RAS**

Sur plus d'une centaine de molécules appartenant à la superfamille RAS, trois gènes *ras* sont particulièrement impliqués dans l'oncogénèse humaine : *H-ras*, *N-ras* et *K-ras*. Ces gènes codent pour de petites protéines de 21 kDa (p21) situées à la surface interne de la membrane plasmique. Ce sont de petites protéines G monomériques qui comprennent 3 sous unités : alpha, bêta et gamma. La sous-unité alpha possède une propriété de liaison au GDP ou GTP et une propriété GTPasique. Les protéines p21<sup>Ras</sup> jouent un rôle central dans la transduction de signaux cellulaires divers notamment la prolifération, la mobilité et l'apoptose.

L'activation de RAS par les récepteurs membranaires (EGF, PDGF, Interleukine, GM-CSF) nécessite son ancrage au feuillet interne de la membrane cellulaire par l'intermédiaire de molécules lipidiques. Ces molécules sont greffées au cours de modifications post-traductionnelles, par des enzymes appelées farnesyltransferases (Ftase) et géranylgeranyltransferases.

En conditions normales, p21<sup>Ras</sup> demeure inactive (liée au GDP). En cas de stimulation par les facteurs de croissance, p21<sup>Ras</sup> se lie provisoirement au GTP, l'hydrolyse rapidement en GDP et active différentes voies de transduction (notamment les voies des MAP kinases ou la voie PI3 kinase-AKT). En cas de mutation, p21<sup>Ras</sup> perd son activité GTPasique et reste sous forme activée même en l'absence de stimulation, entraînant ainsi une dérégulation du contrôle de la croissance cellulaire.

La protéine K-RAS comprend 2 isoformes : K-RAS 4A et K-RAS 4B résultant d'un épissage alternatif et se différenciant par leur partie C-terminale. L'isoforme K-RAS 4A, comme H-RAS et N-RAS, possède un site de palmitoylation en C-terminal permettant sa localisation dans les radeaux membranaires, riches en cholestérol. L'isoforme K-RAS 4B possède un domaine polybasique en lysine ne pouvant être palmitoylé et se localise

préférentiellement dans les endroits désordonnés de la membrane. Les modifications post-traductionnelles des deux isoformes K-RAS 4A et 4B ont une grande influence sur le routage de la protéine au niveau des membranes<sup>66</sup>.

#### **1.2.2.2 Importance de RAS dans le myélome multiple**

La mutation de *ras* est un événement génétique majeur dans la transformation cellulaire et notamment dans l'oncogénèse du myélome multiple. 54,4 % des myélomes présentent une mutation de *K-ras* au diagnostic et 81 % au moment de la rechute. La mutation de *K-ras* survient plus fréquemment que celle de *N-ras* ou *H-ras*<sup>67</sup>.

L'inactivation de la protéine RAS par l'inhibition des farnésyl transférases fait l'objet d'une recherche importante dans le domaine de l'onco-hématologie. Il a été montré que l'utilisation d'inhibiteurs de farnésyl transférases (FTI) dans le myélome multiple<sup>68-70</sup> entraînaient une augmentation de l'apoptose. Le mode d'action des FTI est cependant incomplètement connu, et l'inhibition de la farnésylation de K-RAS pourrait être court-circuitée par une augmentation de l'activité géranylgeranyltransferase<sup>71</sup>.

### 1.2.2.2.3 La transduction du signal par l'intermédiaire de RAS

Une fois activée, la protéine RAS est au centre d'un réseau majeur de la transduction du signal (Figure 6) où deux voies principales peuvent être isolées :

la voie des MAP Kinase (Mitogen Activated Protein Kinase)

la voie PI3 Kinase (phosphatidylinositol 3 phosphate)

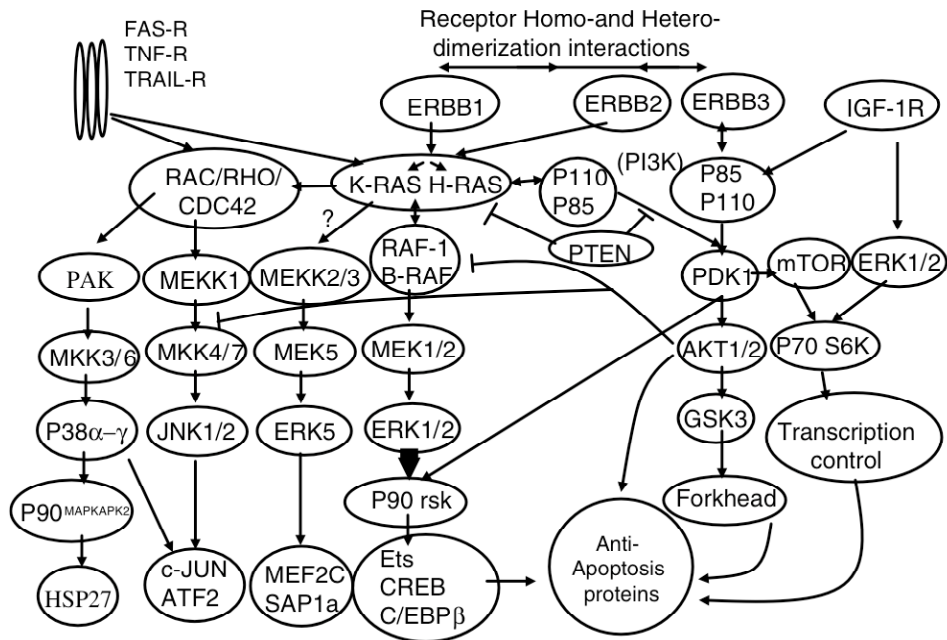


Figure 6 : Les différentes voies de transduction impliquant RAS (d'après Dent<sup>59</sup>).

### 1.2.2.2.3.1 La voie des MAP kinases

Les différents membres de la superfamille des MAPK participent grandement à la transduction du signal et jouent un rôle dans la prolifération, la sénescence, la différenciation, l'apoptose<sup>72</sup> et la réponse aux rayonnements ionisants<sup>59</sup>. Ces protéines doivent leur activité à une double phosphorylation sérine-thréonine qui entraîne la régulation de facteur de transcription ou l'activation de protéines kinases d'aval.

Parmi les MAPK, on distingue trois groupes majeurs :

- La famille ERK (Extra cellular Regulated Kinase) qui possède un rôle majeur dans la prolifération cellulaire et dans la protection contre l'apoptose. Son rôle apparaît notamment essentiel dans la prolifération des cellules myélomateuses dépendantes de l'IL-6 ou mutées sur l'oncogène *ras*<sup>73,74</sup>. Cette voie ERK, appelée également « voie classique », résulte d'une cascade d'activation initiée par RAS puis RAF-1 puis MEK 1/2 (pour « Mitogen activated/Extracellular Kinase »).

- La famille p38 MAPK comprenant 4 isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  qui est souvent associée à l'apoptose mais son rôle est beaucoup plus complexe et souvent controversé. Son activité dans le myélome multiple semble associée à la sécrétion d'IL-6 et de VEGF et donc à la prolifération du myélome multiple<sup>75</sup>.

- La famille c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) encore appelée SAPK (« Stress Activated Protein Kinase ») participe à la régulation de l'apoptose et notamment à l'induction de l'apoptose après rayonnements ionisants<sup>76</sup>. Son rôle est cependant controversé et semble varier selon le type cellulaire ou encore la position dans le cycle cellulaire<sup>77</sup>.



#### **1.2.2.2.3.2 - La voie PI3K**

La voie PI3K est une autre voie majeure induite notamment par RAS et intervenant sur la prolifération, la survie et l'apoptose.

La production de phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate (PIP3) en réponse à l'activation de PI3K permet la translocation d'AKT (appelé également PKB pour Protein Kinase B) vers la membrane plasmique. Une fois ancrée à la membrane, AKT peut être phosphorylé sur la thréonine 308 par PDK 1 (3-phosphoinositid-dependent protein Kinase) et sur la sérine 473 par PDK 2. AKT ainsi activé agit avec de nombreux substrats impliqués dans la régulation de l'apoptose, du cycle cellulaire et de certains facteurs de transcription<sup>78</sup>. L'activation d'AKT a été décrite comme un phénomène important dans la prolifération du myélome multiple<sup>79,80</sup> et comme un élément essentiel dans la réponse aux rayonnements ionisants<sup>81,82</sup>.

#### **1.2.2.2.4 Place de RAS dans la réponse aux rayonnements ionisants**

La littérature fait état de l'implication de l'activation de la protéine RAS (et plus particulièrement son isoforme K) dans la résistance aux rayonnements ionisants<sup>81,83-87</sup> par la voie PI3K et la voie des MAP kinases. Cependant, la mutation activatrice de *ras* ne semble pas nécessairement associée à un phénotype de radiorésistance (fibroblastes, rétinoblaste ou encore kératinocytes) et parfois même reliée à une certaine sensibilité aux rayonnements ionisants<sup>82</sup>. L'implication de RAS dans la réponse aux rayonnements ionisants reste controversée et paraît dépendante du type cellulaire et de l'isoforme *ras* mutée.

### 1.2.3 Effets cellulaires de la radioimmunothérapie alpha

Les modifications biochimiques radioinduites entraînent une réponse cellulaire variant selon de multiples paramètres. À un niveau cellulaire, ces travaux fondamentaux ont permis de déterminer 4 paramètres impliqués dans la modulation des effets des rayonnements ionisants : la réparation des lésions radioinduites, la redistribution dans le cycle cellulaire, la réoxygénation et la repopulation tumorale.

#### 1.2.3.1 Réparation

Les courbes de survie cellulaire sont modélisables sous la forme d'une équation linéaire quadratique (1) ou sous la forme d'une équation linéaire (2) sans épaulement initial, ce qui est généralement interprété comme étant le signe d'une réparation des dommages sub-létaux.

$$(1) \quad \text{Survie} = e^{-(\alpha \cdot \text{Dose} + \beta \cdot \text{Dose}^2)}$$

$$(2) \quad \text{Survie} = e^{-\alpha \cdot \text{Dose}}$$

où  $\alpha$  représente le paramètre en lien avec les lésions létales d'emblée et  $\beta$  les lésions sub-létales réparables.

Les courbes de survie des cellules exposées à une irradiation de Haut TEL ne présentent pas d'épaulement et sont modélisables sous la forme d'une équation exponentielle, ce qui impliquerait une faible importance des mécanismes de réparation dans la survie de ces cellules (Figure 7).

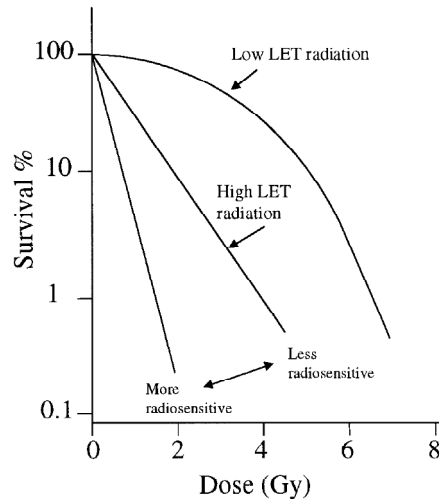


Figure 7 : Exemples de courbes de survie cellulaire après irradiation à haut et bas TEL (d'après Pouget<sup>47</sup>).

La réparation de ces lésions de l'ADN prend une importance capitale et de nombreuses substances pharmacologiques interagissant avec la réparation ont été testées de façon à inhiber ou amplifier les effets sur l'ADN des rayonnements ionisants. Les principales substances étudiées ont été les chimiothérapies anticancéreuses dans le but d'une association avec une irradiation externe. Les antimétabolites (gemcitabine, 5 Fluoro-Uracile...) empêchent la resynthèse nécessaire à la réparation de ces lésions. Les substances agissant directement sur l'ADN comme les alkylants (melphalan, busulfan...), les platinants (cisplatine, carboplatine...), les intercalants (doxorubicine) et les inhibiteurs de topoisomérase I (camptothécine) ou II (étoposide) modifient les cassures radioinduites de l'ADN<sup>88</sup>.

### 1.2.3.2 Redistribution dans le cycle cellulaire

L'efficacité d'une irradiation est liée avec la phase du cycle cellulaire de la cellule, et la phase G2-M du cycle cellulaire est considérée comme la plus radiosensible du cycle cellulaire, alors que la phase S tardive est considérée comme étant la plus résistante<sup>89</sup>. Cette différence de sensibilité impliquerait une disponibilité des enzymes de réparation et de synthèse de l'ADN. Les particules de haut TEL sont sensibles de la même manière que les particules de faible TEL à la redistribution dans le cycle cellulaire<sup>90</sup>.

La synchronisation dans une phase radiosensible comme la phase G2-M sensibilise les cellules à l'action des rayonnements ionisants. C'est ce mécanisme qui a été invoqué pour les taxanes (paclitaxel, docetaxel)<sup>91-93</sup> puisque leur mécanisme d'action principal concerne une polymérisation accrue des microtubules qui bloque les cellules dans cette phase du cycle cellulaire<sup>94</sup>. Ce mécanisme ne semble pas unique et d'autres comme l'apoptose, ou l'oxygénation tumorale ont aussi été invoqués.

### **1.2.3.3 Repopulation tumorale**

La repopulation tumorale est influencée par l'intervalle de temps entre deux fractions d'irradiation. Une repopulation cellulaire accélérée par les rayonnements ionisants impliquerait les signaux de prolifération tumorale comme les récepteurs à l'EGF<sup>95</sup>. Aucune donnée n'est disponible concernant l'influence d'une irradiation de haut TEL sur la repopulation tumorale.

### **1.2.3.4 Réoxygénation**

En présence d'oxygène, les rayonnements ionisants déclenchent la synthèse de radicaux libres oxygénés entraînant des lésions cellulaires plus nombreuses et plus destructrices. Cet effet d'amplification par l'oxygène permet d'expliquer la moindre radiosensibilité des tumeurs hypoxiques. L'effet radiosensibilisant de l'oxygène est moins marqué pour une irradiation alpha en comparaison avec une irradiation par photons X<sup>96</sup>.

## **1.2.4 Influence du faible débit de dose**

La plupart des données de radiobiologie proviennent d'études concernant une irradiation externe à des débits de dose élevés, de l'ordre de 60 Gy/h. La RIT délivre une irradiation dont le pic maximal est de l'ordre de 0,1 Gy/h<sup>97</sup>, soit 1million de fois plus intense que l'irradiation naturelle (0,001 Gy par an), mais seulement 600 fois moins élevé que lors d'une irradiation externe. Cette irradiation par la RIT est continue et son débit est exponentiellement décroissant au cours du temps. Les 4 R (Réparation, Redistribution dans le cycle cellulaire, Repopulation et Réoxygénation) influençant la radiosensibilité tissulaire sont alors revisités à la lumière de l'influence du bas débit de dose. L'ensemble de ces données est en faveur d'une plus grande efficacité de la RIT en comparaison avec l'irradiation externe.

### **1.2.4.1 Influence du bas débit de dose sur la réparation**

Pour ce qui concerne l'influence du débit de dose sur les réparations de lésions radioinduites, Steel<sup>98</sup> a montré que les courbes de survie après une irradiation à la dose de un Gray à 90 Gy/h présentait une allure sensiblement différentes de la même dose d'irradiation mais à 0,9 Gy/h. Les courbes de survie cellulaire sont modélisables sous la forme d'une équation linéaire quadratique à haut débit de dose, et sous la forme d'une équation linéaire à bas débit de dose, sans épaulement initial, ce qui est généralement interprété comme étant le signe d'une réparation des dommages sub-létaux pendant l'irradiation à bas débit de dose.

En introduisant dans ces équations la vitesse de réparation des lésions radioinduites et le temps total d'exposition à l'irradiation, Fowler<sup>97</sup> a comparé la sensibilité à l'irradiation des tissus sains et des tissus tumoraux, de façon à déterminer un index thérapeutique défini comme le rapport effet sur les tissus tumoraux/effets sur les tissus sains. Il a ainsi montré qu'une réduction du débit de dose d'un facteur 600 améliorerait l'index thérapeutique d'un facteur 2,5. Plus le débit de dose est faible, plus l'index thérapeutique augmente, ce qui serait en faveur de la radioimmunothérapie en comparaison avec une irradiation externe. Toutefois, l'importance du débit de dose est liée à une courbe de survie cellulaire modélisable sous la forme d'une équation linéaire quadratique. Or, pour certaines lignées notamment lymphoïdes,

ou pour une irradiation alpha, la modélisation de la survie prend plutôt la forme d'une équation exponentielle, ce qui impliquerait l'absence d'effet du débit de dose sur la survie.

#### **1.2.4.2 Influence du bas débit de dose sur la redistribution dans le cycle cellulaire et la repopulation tumorale**

Les lésions occasionnées par une irradiation à bas débit de dose entraîneraient un arrêt du cycle cellulaire qui non seulement limiterait la repopulation tumorale en cours d'irradiation, mais aussi synchroniserait les cellules dans la phase G2-M du cycle cellulaire considérée comme la plus radiosensible du cycle cellulaire. Cette « auto-potentialisation » de l'efficacité des rayonnements ionisants par l'arrêt en G2-M serait l'explication de l'« inverse dose rate effect »<sup>99</sup>. En effet, certaines lignées présentent une mortalité accrue lorsque le débit de dose diminue<sup>100-102</sup>. Une partie de l'efficacité de la RIT bêta est attribuable à cette inverse dose rate effect, surtout pour ce qui concerne les lignées lymphoïdes<sup>102-104</sup>. Une irradiation alpha provoque un arrêt dans la phase G2-M du cycle cellulaire plus prolongé qu'une irradiation de bas TEL<sup>105</sup>, dont les mécanismes seraient en lien avec une différence dans l'expression de certains gènes induite par irradiation à bas ou haut TEL<sup>106</sup>. La RIT alpha bénéficierait ainsi de ce double avantage.

#### **1.2.4.3 Influence du bas débit de dose sur la réoxygénation**

À bas débit de dose, l'effet oxygène semble moins marqué qu'à haut débit de dose<sup>107,108</sup>. Toutefois, l'association de la RIT bêta avec des substances radiosensibilisantes des cellules hypoxiques<sup>109-111</sup> a montré un effet synergique.

## 1.3 Le Myélome multiple

Au regard des avantages théoriques de la RIT alpha en comparaison avec la RIT bêta, le choix du myélome multiple était d'une grande pertinence comme modèle de développement de la RIT alpha en tant que cible tumorale à cellules isolées ou en petits amas. De plus, nous pouvions bénéficier du soutien du Pr. Bataille (INSERM U601) dont la thématique de recherche porte sur cette pathologie et de la collaboration du Dr John Wijdenes (Diaclone research, Besançon), découvreur d'un anticorps, le B-B4, spécifique des cellules de myélome parmi les cellules médullaires<sup>112</sup>.

### 1.3.1 Données médicales

Près de 2000 nouveaux cas de myélome multiple sont diagnostiqués chaque année en France. Le myélome multiple est à l'origine de 1 % des décès par cancer en France par an, et représente le dixième cancer en termes d'incidence. La moitié des patients sont âgés de plus de 65 ans, et l'incidence du myélome multiple tend à augmenter avec le vieillissement de la population, ce qui bien entendu réduit les possibilités de traitement intensifié chez le patient âgé<sup>113,114</sup>. Malgré des taux de réponse complète initiale souvent proches de 60 %, la survie globale est comprise entre quelques mois et plus de 15 ans, avec une très grande variabilité individuelle. Les facteurs pronostiques traditionnels comme la  $\beta$ 2-microglobuline, l'albumine ou la CRP ne rendent pas suffisamment compte de l'extrême hétérogénéité du myélome multiple. Les facteurs de mauvais pronostic cytogénétique comme les formes non hyperdiploïdes, les délétions du chromosome 13 ou les translocations autres que t(11 ;14)(q13,q32) permettent d'affiner le pronostic individuel. Plus récemment, les profils d'expression génique semblent capables de discriminer avec plus d'exactitude les patients à haut risque en soulignant l'importance des gènes RAN, CHC1L et ZHX-2 (pour revue<sup>115</sup>).

Le traitement standard des patients de moins de 65 ans présentant un myélome multiple est la chimiothérapie intensifiée, notamment sous la forme d'une double autogreffe<sup>116</sup>. Ce traitement permet 28 à 50% de réponses complètes initiales et la médiane de survie sans évènement atteint 30 mois. Les protocoles de chimiothérapie intensive avec allogreffe de moelle osseuse ont permis l'obtention de bonnes réponses<sup>113</sup>, toutefois sa place reste discutée, notamment en raison de sa forte toxicité iatrogénique<sup>117,118</sup>. Pour les patients de plus de 65 ans, l'association Melphalan et Prednisone reste le traitement de référence, et permet d'obtenir un taux de réponse d'environ 40 % chez des patients non traités antérieurement<sup>119,120</sup>. Les chimiothérapies les plus actives dans le traitement du myélome multiple comportent le plus souvent en plus du melphalan et des corticoïdes, le cyclophosphamide, les anthracyclines, la vincristine<sup>121-123</sup>.

Les modifications des relations entre les cellules myéломateuses et leur environnement représentent une arme thérapeutique nouvelle. Au premier plan, la thalidomide<sup>124,125</sup> et ses dérivés moins toxiques de la classe des IMiDs agiraient comme modificateurs de l'angiogénèse tumorale. Ils ont permis l'obtention d'un grand nombre de réponses<sup>126,127</sup> et sont actuellement testées en complément du traitement standard. Le bortezomib permet un blocage de la production d'interleukine 6 en inhibant NF-κB, et a permis d'obtenir un taux de réponse de 35% chez des patients lourdement prétraités<sup>128</sup>. De nombreuses molécules sont cours de développement comme l'arsenic trioxyde, les inhibiteurs du VEGF, les inhibiteurs de farnésyl transférase, les inhibiteurs des histones desacétylase...<sup>115</sup>.



### 1.3.2 Antigènes présents à la surface des cellules de myélome

Le phénotype des cellules plasmocytaires normales est caractérisé par une expression forte pour CD38 et CD138 (syndecan-1), modérée pour CD19 et faible à absente pour CD 56<sup>113</sup>. À l'inverse de ces plasmocytes, les cellules de myélome n'expriment pas CD19 mais expriment fortement CD56, tout en conservant une forte expression pour CD38 et syndecan-1<sup>113</sup>. L'antigène CD138 est particulièrement intéressant puisqu'il n'est exprimé qu'à la surface des cellules de myélome, à l'exclusion des autres cellules hématopoïétiques<sup>112,129-131</sup>. Cet antigène correspond à une protéine de liaison à la matrice extracellulaire sur laquelle se fixent des glycosaminoglycanes susceptibles de modifier son immunogénicité<sup>132</sup>. Ces cellules tumorales produisent des IgG et des IgA ; des mutations somatiques des gènes des immunoglobulines sont caractéristiques des clones myélomateux. 18% des patients présentent un myélome multiple exprimant l'antigène CD20, reconnu par le rituximab ou l'ibrutumomab<sup>133</sup>. La fraction proliférante des cellules de myélome exprime fortement l'antigène CD45 et est positive pour CD11a<sup>134</sup>. D'autres antigènes comme MUC1<sup>135-138</sup> ou HM1.24<sup>139</sup> sont relativement bien représentés à la surface des cellules de myélome. Toutes ces protéines sont ciblables par des anticorps spécifiques dont certains ont déjà été développés lors d'études cliniques<sup>140</sup>.

Notre laboratoire bénéficie du partenariat de la société Diaclone qui a développé un anticorps B-B4 reconnaissant l'antigène syndécan-1 (CD138) porté à la surface de 100 % des cellules de myélome<sup>112,130</sup>. B-B4 ne reconnaît pas la fraction soluble de syndécan-1 à la différence de B-B2. Cet anticorps présente des caractéristiques intéressantes en termes de nombre de sites de liaison et de constante d'affinité extrêmement intéressante<sup>141</sup>. Utilisé seul, l'anticorps B-B4 n'occasionne aucune cytotoxicité, mais couplé à une immunotoxine son utilisation a permis d'inhiber la croissance de cellules de myélome *in vitro*<sup>131</sup>.

### **1.3.3 Place des rayonnements ionisants dans le traitement du myélome multiple**

Les rayonnements ionisants sont fréquemment employés dans le traitement du myélome multiple, essentiellement dans la radiothérapie des localisations osseuses douloureuses, mais aussi lors de l'irradiation corporelle totale avant greffe de moelle osseuse ou dans le traitement des plasmocytomes isolés. Des tentatives récentes de substitution de l'irradiation corporelle totale par l'utilisation de bisphosphonates radiomarqués s'avèrent prometteuses.

La place envisagée de la radioimmunothérapie du myélome multiple, qu'elle soit à l'aide d'émetteurs alpha ou bêta, réside avant tout dans son utilisation comme traitement remplaçant l'irradiation corporelle totale, en combinaison avec le melphalan haute dose, avant greffe de moelle osseuse. En effet, l'irradiation non spécifique probable de la moelle osseuse par le feu croisé de la désintégration du radioélément laisse craindre une toxicité médullaire importante nécessitant une greffe de moelle osseuse, qui serait toutefois moindre en cas d'utilisation d'émetteurs alpha. Bien qu'il ne s'agisse pas d'un immunoconjugué, l'acide phosphonique-1,4,7,10-tetraazacyclodécane-1,4,7,10-tetraméthylène marqué au holmium  $^{166}\text{Ho}$  cible l'os par sa structure à type d'amino-phosphate relié à un émetteur bêta. Le  $^{166}\text{Ho}$ -DOMTP a été utilisé en combinaison avec une chimiothérapie à haute dose et une irradiation corporelle totale avant autogreffe de moelle osseuse pour 77 patients présentant un myélome multiple<sup>142-144</sup>. Des doses de 20 à 40 Gy de  $^{166}\text{Ho}$ -DOMTP ont permis des taux de réponses complète de 43%. En plus de l'immunosuppression attendue, ce traitement a provoqué des cystites hémorragiques, et des syndromes hémolytiques et urémiques.

Ainsi, le myélome multiple reste une maladie incurable au pronostic sombre pour la grande majorité des patients. Une stratégie de ciblage et de destruction spécifiques des cellules myélomateuses par la radioimmunothérapie représente un espoir thérapeutique indéniable.

## 2 Objectifs du travail de thèse

Avant de débiter ce travail, il avait été mis en évidence que la radioimmunothérapie alpha du myélome multiple à l'aide de l'anticorps B-B4 reconnaissant l'antigène syndecan-1 permettait une destruction spécifique des cellules myélomateuses<sup>141</sup>. À partir de ces résultats, nous avons orienté nos travaux vers des expérimentations pouvant permettre une meilleure compréhension des phénomènes cellulaires mis en jeu par la RIT alpha dans le but d'en augmenter l'efficacité thérapeutique.

Pour une meilleure compréhension de ces phénomènes cellulaires, nous avons choisi de faire varier les trois paramètres qui caractérisent la radioimmunothérapie : le vecteur, le radioélément et la cible. Dans un premier temps, nous avons déterminé les caractéristiques de la fixation tissulaire de l'anticorps B-B4, et de comparer cet anticorps avec MA5 reconnaissant l'antigène MUC-1. Notre hypothèse de travail était que l'anticorps B-B4 était un vecteur plus adapté que MA5 pour cibler les lignées de myélome multiple. Dans un deuxième temps, nous avons comparé les effets de la RIT alpha et de la RIT bêta avec le même anticorps marqué tantôt au bismuth 213, émetteur alpha, tantôt à l'iode 131, émetteur bêta, qui est considéré comme un radioélément de référence de la RIT bêta. Les données théoriques étant en faveur de la RIT alpha, nous avons soulevé l'hypothèse que la RIT alpha était plus efficace que la RIT bêta. Dans un troisième temps, nous avons souhaité mieux comprendre la mort cellulaire engendrée par RIT alpha. Ceci impliquait de déterminer avant tout la dose délivrée à chaque cellule, de comparer l'efficacité de la RIT alpha avec une irradiation externe aux photons gamma et de calculer l'efficacité biologique relative pour chaque phénomène engendré par la RIT alpha : mort clonogénique, inhibition de la prolifération et apoptose.

Ce premier temps a apporté des connaissances plus détaillées sur la RIT alpha du myélome multiple et a mis en évidence des différences de radiosensibilité à l'irradiation alpha parmi les lignées de myélome multiple. Nous avons alors orienté notre travail selon deux

axes : d'une part, augmenter l'efficacité de la RIT alpha en y associant des chimiothérapies potentiellement radiosensibilisantes, et d'autre part, mieux comprendre les mécanismes cellulaires pouvant expliquer les différences de radiosensibilité entre les lignées cellulaires.

Le deuxième temps de ce travail de thèse s'est développé autour du thème de la potentialisation des effets de la radioimmunothérapie alpha par différentes chimiothérapies antimitotiques. Dans une première étape, nous avons sélectionné des chimiothérapies pouvant potentiellement interagir de façon synergique avec la RIT alpha parmi les chimiothérapies connues pour leurs propriétés radiosensibilisatrices ou pour leur efficacité dans le traitement du myélome multiple. Nous avons posé l'hypothèse que les effets antitumoraux de la RIT alpha pouvaient être amplifiés de façon supra-additive par une combinaison avec ces chimiothérapies. Dans une deuxième étape, nous avons choisi d'analyser les mécanismes impliqués dans les interactions entre RIT alpha et chimiothérapie, en posant comme hypothèse que les mêmes mécanismes que ceux décrits avec une irradiation externe pouvaient intervenir dans la réponse à une irradiation alpha.

Enfin, dans un troisième temps, nous avons axé nos travaux sur les mécanismes de la radiorésistance à la RIT alpha. Parmi toutes les voies de radiorésistance déjà décrites, nous nous sommes focalisés sur les voies en aval de la protéine RAS, puisque RAS occupe une place importante à la fois comme facteur de radiorésistance à une irradiation X et comme facteur de résistance à l'apoptose induite par les chimiothérapies dans le myélome multiple. Dans un premier temps, nous avons choisi d'étudier les variations de phosphorylation des protéines des voies de transduction du signal activées en aval de RAS, en comparant les effets de la RIT alpha et de l'irradiation gamma. Dans un deuxième temps, nous avons amplifié ces voies de transduction du signal par transfection de RAS. Dans un troisième temps, nous prévoyons d'inhiber ces voies à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques. L'hypothèse conduisant ces travaux était que la RIT alpha active les voies de transduction du signal en aval de RAS.

## 3 Matériel et méthode

### 3.1 Lignées cellulaires et culture

Les lignées cellulaires utilisées ont toutes été cultivées en milieu RPMI 1640 (Sigma), contenant de 10 % de sérum de veau fœtal (*Bio media*), de 2 mM de glutamine, de pénicilline (1000 u/mL) et de streptomycine (1 mg/mL), et placées dans un incubateur à 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> et 100 % d'humidité.

Le myélome multiple regroupe des entités cliniques et biologiques très différentes qui répondent de manière hétérogène aux traitements habituels. Afin de refléter cette hétérogénéité biologique, nous avons retenu 3 modèles cellulaires de myélome multiple humain aux caractéristiques différentes, susceptibles d'interférer avec la réponse aux rayonnements ionisants et de présenter des réponses variables aux traitements (Tableau 3).

Tableau 3 : Caractéristiques des lignées cellulaires de myélome

	Origine	Type	p53	K-Ras	Il-6	Culture
LP1	DSMZ (ACC 41)	IgG	Sauvage	Sauvage	Indépendante	Cellules isolées
RPMI 8226	ATCC (CCL-155)	Chaînes légères lambda	Mutation hétérozygote inactivatrice	Mutation activatrice d'un allèle	Indépendante	Cellules regroupées en grappe
U266	ATCC (TIB-196)	IgE	Mutation hétérozygote inactivatrice	Sauvage	Autocrine	Cellules isolées

Les cellules ont étéensemencées à une concentration de 500.000 cellules/ml deux jours avant le début des tests. Le jour de l'expérience, les cellules ont été recomptées et réensemencées à la concentration désirée.

### 3.2 Anticorps

#### 3.2.1 Caractéristiques des anticorps

##### 3.2.1.1 B-B4

L'anticorps monoclonal B-B4 (Diaclone Research, Besançon, France) a été utilisé sous forme de fragment F(ab')<sub>2</sub>, c'est-à-dire amputé de sa partie constante Fc, ce qui présente l'avantage de limiter la fixation non spécifique de l'anticorps sur les récepteurs à la partie Fc de ces cellules.

#### **3.2.1.2 MA5**

MA5, reconnaissant l'antigène MUC1 a été fourni généreusement par le Dr Goldenberg (Garden State Cancer Center, Belleville, NJ, USA)

#### **3.2.1.3 IgG134**

L'immunoglobuline monoclonale IgG134 a été fourni généreusement par la société Immunothech (Marseille, France). Cette immunoglobuline ne réagissait pas avec les cellules de myélome et a été utilisée comme anticorps non spécifique.

#### **3.2.1.4 BSA**

L'albumine de sérum bovin (BSA) a été utilisée comme vecteur non spécifique pour une irradiation alpha des cellules de myélome multiple.

### **3.2.2 Digestion des anticorps**

L'anticorps B-B4 a été utilisé sous la forme de fragments F(ab')<sub>2</sub>. Après digestion par la pepsine (cristallisée deux fois, Sigma) 50 mg par g de l'anticorps était ajouté et réagissait pendant 2 heures à 37°C. La préparation était ensuite fractionnée par exclusion-diffusion sur une colonne superdex G200 (Pharmacia) équilibrée par 100 nM de tampon phosphate.

### **3.2.3 Couplage avec un agent chélatant**

Afin de fixer l'atome de bismuth 213 à l'anticorps B-B4, l'utilisation d'un agent chélatant est nécessaire. Deux agents ont été utilisés, le Benzyl-DTPA et le CHX-A''-DTPA, plus stable<sup>25</sup>.

## **3.3 Irradiation**

Nous avons eu recours à une irradiation alpha (bismuth 213), bêta (iode 131) et gamma (cobalt 60).

### **3.3.1 Radioimmunothérapie alpha**

#### **3.3.1.1 Radiomarquage au Bismuth 213**

Le bismuth 213 est un isotope de la famille des actinides généré par la désintégration nucléaire de l'actinium 225 dont la demi-vie est de l'ordre de 10 jours. L'actinium 225 est fourni par l'Institut des TransUranien (ITU, Karlsruhe, Allemagne) fixé à une résine d'AGMP-50. Le générateur peut être utilisé pendant environ deux semaines après réception en fonction de son chargement. La colonne de bismuth 213 est éluée avec 2 mL d'une solution contenant 0,1 M HCl et 0,1 M de NaI.

10 à 100 µg de B-B4-CHX-A''-DTPA sont incubés pendant 15 minutes à 37°C dans une solution tampon contenant le bismuth 213 fraîchement élué (37 MBq pour 20 µg d'anticorps). L'anticorps radiomarqué est alors purifié sur une colonne PD10 éluée avec du PBS (Phosphate Buffer Saline, pH 7,4) par fraction de 0,5 mL. Les fractions ayant les plus fortes activités sont regroupées et l'activité spécifique est calculée en Bq/mg d'anticorps. L'anticorps est alors filtré sur filtre 0,22 µm. La pureté radiochimique de l'anticorps est contrôlée par chromatographie sur papier ITSC-LG. Une pureté supérieure à 95% était notée lors de nos expérimentations.

#### **3.3.1.2 Distribution de l'anticorps radiomarqué sur les cellules**

L'anticorps a été dilué dans du milieu de culture pour atteindre la concentration désirée, puis rapidement distribué sur les cellules (250 000 cellules/ml) afin de limiter les écarts d'activité possibles à l'intérieur d'une même expérience.

L'anticorps a été utilisé à une activité spécifique variant de 150 MBq/mg à 600 MBq/mg.

### **3.3.2 Irradiation externe au <sup>60</sup>Co**

Les expérimentations d'irradiation gamma ont été réalisées grâce à une source de cobalt 60 (Centre René Gauducheau, Nantes-St-Herblain) ayant un débit de dose de 1 Gy/min.



### **3.3.3 Radiomarquage à l'iode 131, émetteur bêta**

Les anticorps ont été marqués à l'iode 131 (Schering AG, Gif-sur-Yvette, France) par la méthode de l'iodogène<sup>145</sup>.

## **3.4 Chimiothérapies**

### **3.4.1 protocoles d'administration**

Les chimiothérapies ont été utilisées selon deux protocoles :

- Protocole 1 : la chimiothérapie est incubée 2 heures avant l'ajout de l'anticorps radiomarqué.
- Protocole 2 : la chimiothérapie est administrée 24 heures avant l'ajout de l'anticorps radiomarqué.

### **3.4.2 chimiothérapies**

- La Doxorubicine (Pharmacia) est préparée extemporanément dans du NaCl 0,9 %. Elle appartient à la famille des anthracyclines. Il s'agit d'un agent s'intercalant entre les bases d'ADN, stabilisant les complexes clivables ADN – topoisomérase II et provoquant ainsi des coupures de l'ADN. Par ailleurs, la doxorubicine induit la formation de radicaux libres. Son action est prédominante en phase S du cycle cellulaire, mais elle agit aussi sur la transition S/G2.

- La Vinblastine (Lilly France) est préparée extemporanément dans du NaCl 0,9 %. La vinblastine appartient à la famille des alcaloïdes de la pervenche. Ce poison du fuseau interagit avec la tubuline par inhibition de sa polymérisation qui conduit à l'interruption de la mitose et de la réplication cellulaire. Son action est prédominante en phase M du cycle cellulaire.

- La Dexaméthasone (Qualimed) était dilué dans du sérum physiologique jusqu'à la concentration désirée.

- Le Paclitaxel (Bristol-Myers-Squibb) est un taxoïde extrait de l'if. Il se lie à la tubuline, favorisant sa polymérisation en microtubules. Cette fixation stabilise les microtubules et inhibe leur capacité de dépolymérisation. Ceci conduit à l'interruption de la

mitose et de la réplication cellulaire. Son action est prédominante en fin de la phase G2 et en phase M du cycle cellulaire.

- La Gemcitabine (Lilly France) est préparée dans une solution de NaCl à 0,9 %. La Gemcitabine appartient à la famille des analogues nucléosidiques qui nécessite une activation intracellulaire (phosphorylation). Ses dérivés actifs sont de puissants inhibiteurs de la synthèse d'ADN qui interrompent son élongation en réplication. Sa forme active triphosphatée entre en compétition avec les désoxyriboucléotides dCTP pour l'incorporation dans l'ADN via les polymérase alpha et epsilon. Son action est prédominante en phase S du cycle cellulaire.

### **3.5 Mesures expérimentales cellulaires**

#### **3.5.1 Mesure de la prolifération cellulaire par incorporation de thymidine tritiée**

Les cellules sont ensemencées en quadruplicate en plaque 96 puits à fond rond (Nunclon) à raison de 12500 cellules/puits. 30 µL d'une solution de thymidine tritiée (Amersham Biosciences,) à 100µCi/mL sont alors ajoutés. Après 4 heures d'incubation à 37°C, les cellules sont récoltées (Harvester, TOMTEC) sur filtres (Wallac) puis séchées. La radioactivité incorporée est alors mesurée (1450 Microbeta Plus, Wallac).

#### **3.5.2 Quantification de la synergie, de l'additivité ou de l'antagonisme par la méthode de Chou-Talalay**

Afin d'évaluer les effets entre deux agents, nous avons calculé un indice de combinaison (IC) en utilisant l'équation de Chou-Talalay<sup>146</sup>,

Les courbes de prolifération d'incorporation de thymidine sont modélisées par une équation sigmoïde. L'équation générale d'un isobogramme (IC=1) est :

$$IC = (D)_1/(Dx)_1 + (D)_2/(Dx)_2$$

(Dx)<sub>1</sub> est la concentration de chimiothérapie qui inhibe la prolifération cellulaire de x % quand elle est utilisée seule.

(Dx)<sub>2</sub> est la concentration de B-B4-<sup>213</sup>Bi qui donne x % d'inhibition de la prolifération quand délivrée seule.

(D)<sub>1</sub> et (D)<sub>2</sub> sont les doses de chimiothérapie et de RIT alpha qui produisent une inhibition de x % lorsqu'elles sont associées.

- si l'indice de combinaison est inférieur à 0,9, il indique une synergie

- si IC est compris entre 0,9 et 1, il indique une additivité d'effets
- si IC est supérieur à 1,1, les effets sont antagonistes

### 3.5.3 Mesure de la survie clonogénique par dilution limite

La survie après irradiation seule ou associée à la chimiothérapie est définie par la capacité des cellules à former des colonies en utilisant la technique de dilution limite.

Après traitement, les cellules sont incubées 24 heures à 37°C. Elles sont alors comptées, diluées et distribuées dans des plaques 96 puits à fond rond à des concentrations moyennes de 1000, 333, 111, 37, 12, 4, 1 et 0,5 cellules par puits dans 200 µL de milieu. Les cellules sont laissées en culture 4 semaines et font l'objet d'une étude microscopique et macroscopique. Les puits sont positifs lorsque la colonie est formée d'au moins 64 cellules. La meilleure représentation de la survie cellulaire est une courbe exponentielle de type  $y = e^x$ . À partir de cette équation, nous pouvons mesurer la D létale moyenne,  $D_0$ , et calculer la « mean inactivating dose » (MID) qui correspond à l'aire sous la courbe<sup>147</sup>. Nous pouvons alors déduire le rapport d'amplification de l'irradiation ou RER « Radiation Enhancement Ratio » :

$$\text{RER} = \text{MID RIT alpha} / \text{MID chimiothérapie} + \text{RIT alpha}$$

Un rapport supérieur à 1 indique une radiosensibilisation alors qu'un rapport inférieur à 1 implique une radiorésistance.

### 3.5.4 Mesure de l'apoptose

La mesure de l'apoptose a été réalisée grâce à l'utilisation d'un anticorps murin APO 2.7 (APO 2.7- PE Immunotech) dirigé contre un marqueur précoce de l'apoptose. Ce marqueur est une protéine mitochondriale dont l'expression n'apparaît que pendant la mort cellulaire programmée. Après traitement, les cellules sont fixées avec du paraFormaldéhyde 4 % et peuvent être conservées à 4°C. Après rinçage en PBS, les cellules sont remises en suspension dans 5 µL d'Apo 2.7 et 95 µL de PBS et incubées en présence de l'anticorps pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite centrifugées et lavées dans du PBS. L'analyse se fait par cytométrie en flux (FACScan, Becton Dickinson) par mesure d'un histogramme en FL2-H.

### 3.5.5 Analyse du cycle cellulaire

L'analyse du cycle cellulaire est réalisée en cytométrie de flux après marquage de l'ADN avec l'iodure de propidium.

Après traitement, de 1 million à 5 millions de cellules sont fixées dans de l'éthanol 70 % froid permettant la perméabilisation des membranes. Une fois centrifugées, les cellules sont suspendues dans 200 µL d'une solution contenant 40 µg/mL d'iodure de propidium (Sigma), 100 µg/mL de RNase (Sigma) complétés par du PBS. La suspension est incubée 30 minutes à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. Les cellules sont alors analysées en cytométrie de flux (FACSCan, Becton Dickinson).

### **3.5.6 Mesure de l'internalisation de l'anticorps B-B4**

L'anticorps B-B4 est marqué à l'iode 125 (Amersham biosciences) par la méthode de l'iodogène. Les cellules sont alors incubées pendant une heure à 4°C dans un mélange d'anticorps radiomarqué et d'anticorps froid est incubé. Après 2 lavages en milieu à 4°C, des aliquotes de 10<sup>6</sup> cellules sont placés dans des puits contenant 200 µl de milieu et incubés à 37°C pendant différent temps (0 - 5 - 10 -15 - 30 - 45 - 90 -180 min). À chaque temps, les plaques sont centrifugées à 4°C, le surnageant est aspiré et compté au compteur gamma e qui détermine la quantité totale d'anticorps fixée sur les cellules, puis les cellules sont incubées 15 min avec du milieu ajusté à pH 2. Les surnageants de lavages sont récupérés et comptés ce qui détermine la quantité d'anticorps fixée sur la membrane cellulaire. Enfin le culot cellulaire est compté ce qui détermine la quantité d'anticorps internalisée.

## **3.6 Analyses par méthodes biochimiques**

### **3.6.1 Analyse de l'expression protéique par western blot**

Les culots secs de cellules traitées sont suspendus dans un tampon de lyse pour protéines phosphorylées contenant 10 mM Tris HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 0,5 % IGEPAL CA-620, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 mg/ml aprotinine, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 100 mM Na F et 1µg/ml leupeptine.

Après agitation toutes les 10 minutes pendant 40 minutes et replacés sur glace entre chaque agitation, les lysats sont centrifugés à 10 000 tours par minute pendant 30 minutes à 4°C. La concentration protéique du surnageant est mesurée à l'aide de l'acide bicinchoninic selon la méthode de Biuret (BCA protein Assay, Pierce Rockford, IL, USA).

Pour l'ensemble des gels réalisés, 100 µg de protéines dénaturées (3 minutes à 95 °C) sont déposés par puits.

Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de sodium dodecyl sulfate (SDS) - acrylamide 10 %. Plongé dans une solution tampon de migration (25 mM Tris base, 192 mM glycine, SDS 0,1 %, pH8,3), le gel est soumis à un champ électrique de 200 V pendant 45 minutes. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de polyvinylidene difluoride (PVDF, Millipore), préalablement activée dans un bain de méthanol (1 minute). Le transfert est réalisé en appliquant un champ électrique de 70 mA constant pendant deux heures. Le transfert se fait à 4°C sous agitation, à l'aide de cassette BIORAD Mini-PROTEAN II gel plongée dans un tampon de transfert contenant 25 mM de Tris base, 192 mM de glycine et 20 % de méthanol.

Après cette étape de transfert, la membrane contenant les protéines est plongée dans une solution bloquante (Western Blot Reagent, Roche) diluée à 10 % dans du TBS (Tris Buffer Saline) pendant 1 heure à température ambiante, sous agitation lente. Cette opération permet de bloquer les sites non spécifiques de la membrane. La membrane est alors incubée en présence de l'anticorps primaire sous agitation lente, à 4°C, puis lavée deux fois 20 minutes, sous agitation rapide, dans une solution de TBS-Tween 0,1 %. On incube alors la membrane avec le deuxième anticorps, dirigé contre la partie constante du premier et couplé à l'enzyme peroxydase, pendant 1h30 à température ambiante et sous agitation lente. Après deux lavage de 20 minutes en TBS-Tween 0,1 %, l'activité enzymatique est mesurée par chimiluminescence (BM Chemoluminescence Blotting Substrate, Roche) sur film de révélation (Hyperfilm, Amersham Biosciences).

Tous les anticorps primaires utilisés sont distribués par Cell signaling Technology Inc et dilués au 1/1000<sup>ème</sup> dans du TBS +10 % Western Blot Reagent (Roche). Le tableau suivant énonce les différents anticorps primaires utilisés et le poids moléculaire des protéines dont ils sont a priori spécifiques.

Tableau 4 : anticorps primaires utilisés dans la technique de western blot

Anticorps	PM de la Protéine ciblée en kDa
Anti-phospho AKT (ser 473)	60
Anti AKT	60
Anti phospho ERK 1/2 (thr 202/tyr 204)	ERK 1 = p44 ERK 2 = p42
Anti ERK 1/2	ERK 1 = p44 ERK 2 = p42
Anti phospho RAF-1 (ser 259)	74
Anti phospho p38 MAPK (thr 180/tyr 182)	43
Anti phospho SAPK/JNK (thr186/tyr 185)	46, 54

Contre les anticorps primaires précédemment cités, l'anticorps secondaire utilisé est une IgG anti-lapin, anti-souris (Roche) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans du TBS +10 % Western Blot Reagent (Roche). L'anticorps de contrôle anti-actine est fourni par Santa Cruz et est dilué au 1/2000<sup>ème</sup> dans du TBS additionné de western block reagent à 10% (Roche). L'anticorps dirigé contre cet anticorps est une IgG anti-chèvre (Chemicon) diluée au 1/5000<sup>ème</sup> dans du TBS - western block reagent à 10 % (Roche). Les films sont ensuite numérisés et analysés à l'aide du logiciel ImageJ 1.32J (NIH).

## 3.7 Biologie moléculaire

### 3.7.1 Techniques

#### 3.7.1.1 Extraction d'ARN totaux

L'isolement des ARN totaux a été réalisé à l'aide de la trousse d'extraction RNABle® (Eurobio). Le principe d'extraction repose sur la formation de complexes entre l'ARN et l'isothiocyanate de guanidine qui permettent de rompre les interactions hydrophiles entre l'ADN et les protéines. 5 millions de cellules sont resuspendues dans 1 mL de RNABle® additionné de 100 µL de chloroforme. Le mélange est agité vigoureusement pendant 30 secondes et laissé au repos pendant 5 minutes sur glace. Après centrifugation à 4°C (15 minutes à 12000g), l'homogénat forme deux phases : la phase phénolique et l'interphase

contiennent l'ADN et les protéines et la phase aqueuse contient les ARN. Pour la précipitation de l'ARN, la phase aqueuse est transférée dans un tube neuf et un volume d'isopropanol y est ajouté. Une période de repos de 5 minutes est alors observée à température ambiante puis le mélange est centrifugé 5 minutes à 12000g. Le précipité d'ARN apparaît alors blanc jaunâtre dans le fond du tube. Après élimination du surnageant, le culot est ensuite lavé deux fois avec 1 mL d'éthanol 75 % (en vortexant 30 secondes) puis centrifugé 5 minutes à 7500g. Le précipité est alors séché sous vide pendant 10 minutes et repris dans 40 µL d'eau stérile. Pour la conservation, les ARN totaux sont gardés à -80°C.

### **3.7.1.2 Rétro-Transcription spécifique (RT spécifique)**

2,5 µL d'ARN sont déposés dans un tube PCR de 0,5 mL. On ajoute 2,5 µL de tampon RT (5X First-Strand Buffer, Gibco BRL, composé de 200 mM de tris-HCl (pH7,5), de 100mM NaCl, de 0,1 mM d'EDTA, de 1 mM de dithiothreitol, de 0,01 % de NP-40 et de 50% de glycérol), 1,25 µL de dithiothreitol (100 mM), 5 µL de dNTP (2,5 mM chacun), 0,5 µL d'oligonucléotide 3' (50 pmol/µL), 0,25 µL d'inhibiteur de Rnase (Rnasin, Promega) et 0,5µL de retro transcriptase (M-MLV RT, Gibco BRL). Le mélange est incubé 45 minutes à 42°C.

### **3.7.1.3 Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)**

Sur la totalité du produit obtenu après la rétro transcription spécifique, on ajoute 5 µL de tampon PCR (thermophilic DNA polymerase 10X Buffer, Promega, composé de 10 mM de tris-HCl (pH 9), 50 mM de KCl et 0,1 % de Triton X-100), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,5 µL d'oligonucléotide 5' (50 pmol/µL), 30,25 µL d'eau stérile et 0,25 µL de Taq DNA Polymerase (Promega). Le mélange est ensuite placé dans un thermocycleur (PTC 200, MJ research). La réaction se déroule sur 30 cycles, chaque cycle comprenant trois phases : 1 minutes de dénaturation à 94°C, 1 minutes d'hybridation à 55°C et 1 minute d'élongation à 72°C.

### **3.7.1.4 Ligation**

La ligation est effectuée grâce à l'enzyme T4 DNA Ligase (Gibco BRL) avec des quantités équivalentes de fragments à cloner et de vecteur (de l'ordre de 100ng) estimées sur gel d'agarose. La réaction se fait dans les conditions suivantes : 50 mM Tris-HCl (pH7,5),

10mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiotreitol, 1 mM ATP et 25 µg/mL de BSA. La réaction a lieu à 16°C sur la nuit.

### **3.7.1.5 Electroporation**

Dans une cuve d'électroporation, 100 µL de bactéries électrocompétentes (XL1, variété d'*Escherichia Coli* résistante à la néomycine) sont mises en présence de 1 µL du produit de ligation dilué au tiers dans de l'eau. Les bactéries sont électroporées à 2,5 kW (système Biorad) puis 1 mL de milieu 2XTY préchauffé à 37°C est ajouté. Les bactéries sont alors transvasées dans un tube neuf et incubées à 37°C pendant 1 heure. Les bactéries sont ensuite centrifugées, resuspendues dans 100 µL de milieu 2XTY et étalées sur boîte de pétri contenant du milieu 2XTY et un antibiotique de sélection.

Les bactéries XL-1 sont sélectionnées sur milieu 2XTY additionné de 15 µg/mL de tétracycline (Sigma).

Pour le vecteur pBlueScript SK+, le milieu 2XTY est additionné d'ampicilline à une concentration de 100 µg/mL (Sigma).

Pour le vecteur pEGFP-C3, le milieu est additionné de 20 µg/mL de kanamycine (Sigma).

### **3.7.1.6 Mini-préparations de plasmides**

Afin d'extraire les plasmides contenus dans une souche bactérienne XL1, on utilise la technique des "minipreps".

La veille de l'extraction plasmidique, 2 mL de milieu de culture 2XTY (additionné de l'antibiotique de sélection) sont inoculés avec une colonie bactérienne issue de l'électroporation. Le milieu inoculé est placé à 37°C sur la nuit.

#### **3.7.1.6.1 Lyse bactérienne alcaline**

1 ml de la culture est centrifugé. Le culot bactérien est repris dans 100 µl de Solution I (Glucose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH8, EDTA 1mM pH8) puis on ajoute 200 µL de la Solution II (Na OH 0.2 N, SDS 1 %). La solution de lyse est fortement alcaline et contient un détergent qui cause la formation de pores dans la paroi bactérienne et entraîne la dénaturation des acides nucléiques, dont ceux de très haut poids moléculaire. Les plasmides et les ARN



pourront alors sortir par les pores alors que l'ADN génomique restera dans la cellule, étant donné qu'il est fixé à la membrane.

Puis on ajoute 150 µL de la solution neutralisante III (Acétate de potassium 3M). Les acides nucléiques vont se renaturer. Cependant, l'ADN génomique beaucoup plus grand ne retrouve que partiellement sa forme initiale et reste insoluble avec la membrane.

Une centrifugation de la solution permet de précipiter les débris insolubles.

### **3.7.1.6.2 Purification au phénol-chloroforme.**

500 µL de phénol - chloroforme (50/50) sont ajoutés à la solution. Après centrifugation, la phase aqueuse supérieure est transférée dans un nouveau tube Eppendorf. Elle contient les plasmides et les ARN.

### **3.7.1.6.3 Précipitation**

Les acides nucléiques sont précipités par de l'éthanol absolu (1ml, 15 minutes à - 20°C). Une centrifugation isole le culot d'acides nucléiques. Celui-ci est lavé par de l'éthanol 75 % puis repris après dessiccation dans 19 µl de T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) et 1 µl de RNase 1mg/ml (*QIAGEN*).

La purification est vérifiée sur un gel d'agarose 1,5 % dans du tampon TAE 1X (Tris-Acétate 40 mM, EDTA 1 mM).

### **3.7.1.7 Purification de fragments d'ADN**

La purification est réalisée grâce au coffret GFX (Amersham Pharmacia Biotech) utilisé selon les recommandations du fournisseur. La purification nécessite un agent chaotrope qui dénature les protéines, dissout l'agarose et favorise l'accrochage des molécules d'ADN sur une matrice en fibre de verre. L'ADN ainsi capturé est élué dans un tampon de faible force ionique (TE ou eau).

### **3.7.1.8 Coupures enzymatiques**

Les différentes coupures enzymatiques ayant servi au clonage des plasmides pEGFP-C3-K-ras ont été réalisées à l'aide des enzymes New England Biolabs en suivant les recommandations du fournisseur. Le temps de réaction est de 2 heures à 37°C pour 100 ng coupés.

### **3.7.1.9 Déphosphorylation des vecteurs ouverts**

Cette étape permet d'empêcher la ligation des vecteurs sur eux-mêmes lors de la ligation d'un fragment d'ADN avec un vecteur ouvert.

Les vecteurs pEGFP-C3 et pBlueScript SK+, après ouverture enzymatique, sont déphosphorylés grâce à l'enzyme Alcaline Phosphatase (Amersham).

### **3.7.1.10 Phosphorylation des oligonucléotides**

Lorsque l'on utilise des oligonucléotides phosphorylés lors de RT-PCR, les fragments amplifiés portent un groupement phosphate à leurs extrémités et peuvent ainsi se liquer avec un vecteur déphosphorylé.

Cette étape réalisée à 37°C pendant 1 heure dans un volume final de 40 µL en présence de 4 µL d'oligonucléotides (500 µM), 4 µL d'ATP (10 mM), 8 µL de tampon Forward Buffer (Gibco BRL), 2 µL de l'enzyme T4Polynucléotide Kinase (Gibco BRL) et de 22 µL d'eau.

### **3.7.1.11 Transfection cellulaire**

Afin d'introduire les différents gènes *K-ras* dans les cellules U266, nous avons testés deux techniques de transfection :

transfection à base de lipofectamine (Polyfect, Qiagen)

transfection avec le système nucleofector™ d'Amaxa, système associant impulsions électriques et réactifs chimiques pour un routage du plasmide vers le noyau.

#### **3.7.1.11.1 lipofectamine**

Les cellules U266 sont semées à une concentration de 500 000 cellules/mL en plaque 12 puits (1,5 mL par puits). De 1 à 5 µg d'ADN sont complexés avec 1,2 6 et 12 µL de Polyfect Transfection Reagent (Qiagen). Le volume final est ajusté à 75 µL avec du milieu de culture sans SVF et incubé pendant 10 minutes à température ambiante afin d'établir la complexation entre le plasmide et le Polyfect. Le mélange est ensuite ajouté sur les cellules U266. Les cellules sont alors incubées à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> sur la nuit. La vérification se fait sous microscope à lampe UV (480 nm). En effet, les cellules ayant intégrées le plasmide pEGFP-C3 et synthétisant la protéine GFP sont excitées par les UV et réémettent dans le vert (507 nm).

### **3.7.1.11.2 Nucléofector<sup>tm</sup>**

5 millions de cellules sont centrifugées puis suspendues dans 100 µL de solution de Nucleofector R. 2 à 5 µg d'ADN (pEGFP-C3-K-Ras) sont ajoutés. L'électroporation est réalisée dans une cuve et un électroporateur Amaxia (programme T1). Après l'impulsion électrique, les cellules sont immédiatement placées dans du milieu complet RPMI 1640 à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. La vérification, après 24 heures d'incubation, se fait également sous microscope à lampe UV (480 nm).

### **3.7.1.11.3 Sélection antibiotique**

Le plasmide pEGFP-C3 comporte un gène de résistance à la néomycine (GibcoBRL), les cellules U266 ayant reçues le vecteur sont donc résistantes à cet antibiotique.

48 heures après la transfection, on ajoute sur les cellules U266 la néomycine, à une concentration finale de 0,4 mg/mL afin de sélectionner les cellules ayant reçu le vecteur pEGFP-C3.

## **3.7.2 clonage et transfection des plasmides pEGFP-C3- K-Ras**

Toutes nos constructions ont été réalisées dans le vecteur d'expression pEGFP-C3 (Clontech). Le vecteur pEGFP-C3 code pour une variante de la GFP « Green Fluorescent Protein » sous la dépendance d'un puissant promoteur eucaryote de cytomégalovirus (CMV) et émettant ainsi une fluorescence verte élevée dans les cellules de mammifères lorsqu'elle est excitée à 480 nm.

Ce vecteur dispose également d'un gène de résistance aux aminosides :

La résistance à la kanamycine permet une sélection des bactéries transformées par le plasmide.

La résistance à la Néomycine permet une sélection des cellules transfectées par le plasmide.

### **3.7.2.1 pEGFP-C3-K-Ras 4B**

Le plasmide pEGFP-C3-K-Ras 4B cloné dans le pEGFP-C3 en Hind III – Apa I nous a été offert par le Pr. A. Cox.

### 3.7.2.2 pEGFP-C3-K-Ras 4A muté

Nous avons tout d'abord construit le plasmide pEGFP-C3-K-Ras 4A muté. Pour cela, nous avons extrait les ARN totaux des cellules RPMI 8226 grâce à la trousse d'extraction RNable (Eurobio). Cette lignée cellulaire comporte une mutation du gène K-Ras sur le codon 12 (glycine remplace alanine) qui confère à la protéine mutée une forme toujours active. Ensuite, nous avons procédé par RT-PCR. L'étape de rétrotranscription a été réalisée à l'aide de l'oligonucléotide 3' (CGTAATATTACATTAGACCCACAACCCTAGGAA) qui comporte une séquence spécifique de l'extrémité 3' de K-Ras 4A flanqué du site de restriction enzymatique BamHI (g/gatcc).

Sur l'ADNc ainsi obtenu, une amplification d'ADN par PCR a été réalisée à l'aide de l'oligonucléotide 5' (TGAAGCTTATGACTGAATATAAACTTGTGG) comportant une séquence spécifique de l'extrémité 3' de K-Ras (ATG marque le début de la transcription) flanqué du site de restriction enzymatique Hind III (a/agctt).

Le produit PCR devait mesurer 595 paires de bases. Cette taille a été vérifiée sur gel d'agarose 1,5 % et le produit purifié sur colonne GFX (Amersham Pharmacia Biotech).

L'étape suivante a consisté à introduire le gène *K-ras 4A* muté dans le vecteur bactérien pBluescript II SK+ - cette étape intermédiaire permet de travailler le gène avec plus de facilité.

Le produit PCR a été cloné dans le vecteur pBluescript II SK+ en Sma I. Cette enzyme de restriction possède un site de coupure unique dans le site de clonage du vecteur pBluescript II SK+. La coupure enzymatique provoque des extrémités franches qui ne permettent pas d'orienter le gène amplifié. La ligation du gène amplifié sur le vecteur pBluescript II SK+ a été réalisée sur la nuit à 16°C. Après électroporation en présence de plasmides ligés, les bactéries sont mises en culture sur milieu sélectif ampiciline à 100 µg/mL (le gène de résistance à l'ampicilline est porté par le vecteur). Afin de vérifier la présence du plasmide pBSSK+ -K-Ras 4A muté dans les bactéries, on a extrait l'ADN plasmidique des bactéries par la méthode de lyse alcaline. Une fois le plasmide isolé, il est procédé à une digestion enzymatique par Hind III et Bam HI dont les sites (introduits lors de la PCR) sont situés de part et d'autre du gène inséré dans le site de clonage. Les produits issus de la coupure mesurant 595 pb ont alors été séquencés. Les plasmides séquencés se sont avérés positifs, c'est-à-dire qu'ils contenaient le gène d'intérêt muté.

L'étape suivante a consisté à produire le plasmide pEGFP-C3-K-Ras 4A muté. Dans un premier temps, nous avons coupé le vecteur pEGFP-C3 par Sma I et Bam HI puis nous avons

extrait le gène *K-ras 4A* muté par double digestion du plasmide pBSSK+-*K-Ras 4A* muté par les enzymes EcoR V et BamHI. La ligation des deux produits nous a permis d'obtenir le plasmide pEGFP-C3-*K-Ras 4A* muté. Un séquençage de contrôle a été réalisé avec succès sur plusieurs clones.

### 3.7.2.3 pEGFP-C3-*K-Ras 4A*

A partir du plasmide pEGFP-C3-*K-Ras 4B*, offert par le Pr. Cox, nous avons réalisé une double digestion EcoRI – BamHI, et récupéré le vecteur additionné de la partie non muté et constante entre *K-ras 4A* et *K-ras 4B*. Ensuite, nous avons procédé à la même double digestion sur le plasmide pEGFP-C3-*K-Ras 4A* muté, où nous avons récupéré la partie spécifique de *K-ras 4A*. Le clonage des deux parties purifiées a donc permis l'obtention du plasmide pEGFP-C3-*K-Ras 4A*. Plusieurs clones ont été séquencés.

### 3.7.2.4 pEGFP-C3-*K-Ras 4B* muté

Les étapes d'obtention de pEGFP-C3-*K-Ras 4B* muté ont été les suivantes :

- double digestion Hind III - BamHI du vecteur pBSSK+ vide
- double digestion Hind III - EcoRI de pEGFP-C3-*K-Ras 4A* muté : récupération de la partie constante *K-ras* mutée (418 pb)
- double digestion EcoRI – BamHI de pEGFP-C3 – *K-ras 4B* : récupération de la partie terminale de *K-ras 4B* (156 pb)
- ligation des 3 fragments purifiés
- obtention de pBSSK+ - *K-ras 4B* muté
- double digestion XhoI - BamHI de pBSSK+ - *K-ras 4B* muté
- double digestion XhoI - BamHI de pEGFP-C3 seul
- ligation des 2 fragments
- obtention de pEGFP- C3 – *K-ras 4B* muté
- Séquençage de contrôle

Suite à ce travail de biologie moléculaire, nous disposons de quatre plasmides vérifiés par séquençage : pEGFP- C3 – *K-Ras 4A*, pEGFP- C3 – *K-Ras 4A* muté, pEGFP- C3 – *K-Ras 4B* et pEGFP- C3 – *K-Ras 4B* muté.

### 3.7.2.5 transfection

Pour transférer les plasmides dans les cellules U266, nous avons tout d'abord opté pour la lipofectamine (Polyfect Transfection Reagent, Qiagen). 24 heures après transfection, nous voyions, sous lampe UV, quelques cellules vertes. Nous les avons donc sélectionnées en ajoutant la néomycine (0,4 mg/mL) après avoir testées une gamme de concentration de l'antibiotique sur les cellules natives. Après deux semaines de sélection, aucune cellule verte n'était visible, laissant croire que les transfusions étaient transitoires. Après avoir échoué plusieurs fois, nous sommes passés au système Nucléofecor (Amara). Le taux de transfection était alors plus élevé mais la sélection ne s'est encore pas avérée concluante. En effet, après deux semaines de sélection, toutes les cellules vivantes n'étaient pas vertes. Nous avons donc trié les cellules par cytométrie en flux, en gardant les cellules qui réemettaient le plus fortement dans le vert. À partir de ces cellules triées, nous avons réalisé un clonage et avons récupéré plusieurs clones de *K-ras* 4A muté et de *K-ras* 4B muté. Un seul clone de *K-ras* 4B a pu être sorti mais aucun de *K-ras* 4A n'a poussé. Après plusieurs échecs de retransfection de *K-ras* 4A, nous avons commencé les études sur les autres clones.

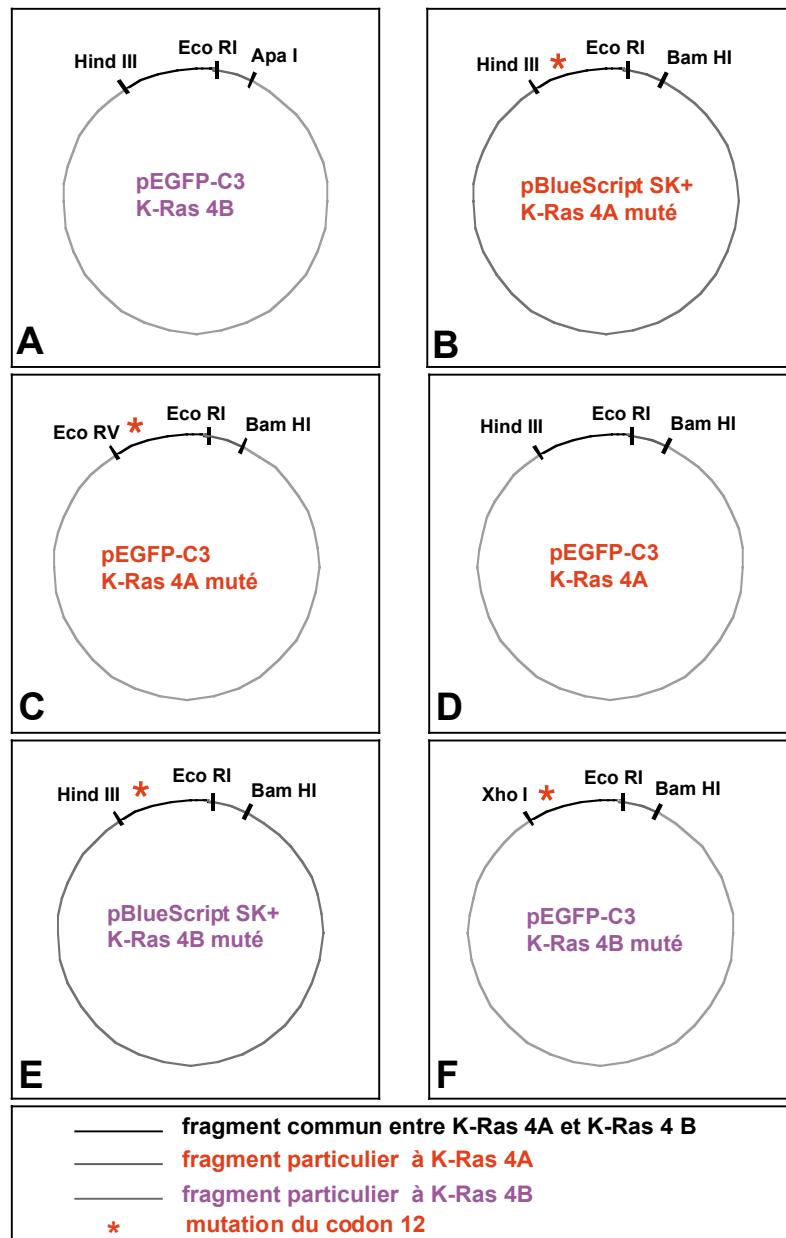


Figure 8 : Cartes schématiques des différentes constructions

### 3.8 Méthodes statistiques

Toutes les données ont été analysées à l'aide du t-test de Student ou du test rank sum de Mann-Whitney (SIGMASTAT software, Jandel Scientific). Le seuil de significativité était fixé à  $p < 0,05$ .

### 3.9 Étude dosimétrique

Le modèle dosimétrique qui a été choisi est basé sur celui développé par Stinchcomb et Roeske<sup>49</sup>. Il a pour objectif le calcul des distributions statistiques des dépôts d'énergie dans la cible considérée (noyau ou cytoplasme) au sein d'une cellule soit isolée, soit appartenant à une monocouche ou une grappe cellulaire.

Ce modèle vise à calculer le spectre des dépôts d'énergie au sein d'une cellule cible considérée, et, ce, pour des distributions, de sources et de cellules cibles, variables. La forme des cellules et de leur noyau sont toutes considérés sphériques et, par ailleurs, noyau et membrane cellulaire sont concentriques. La distribution de sources est de trois types

distribution volumique (solution radioactive baignant la cellule cible),  
distribution surfacique (radioéléments fixés à la surface de la cellule cible),  
distribution de sources à la surface des cellules voisines de la cellule cible.

Ce modèle dépend de trois types de distribution des cellules irradiées :

cellule isolée,  
monocouche de cellules (en suspension ou au fond d'un puits de culture)  
cluster ou amas cellulaire (régulier ou aléatoire).

Ces calculs aboutissent à déterminer un coefficient permettant calculer la dose délivrée en fonction de l'activité ajoutée.



## 4 Résultats

### 4.1 Anticorps et radioélément

Des travaux au sein de notre laboratoire avaient montré que la RIT alpha du myélome multiple à l'aide de l'anticorps B-B4 reconnaissant l'antigène syndecan-1 ou CD138, marqué au bismuth 213 était efficace *in vitro* en comparaison avec un anticorps non spécifique<sup>141</sup>. Ces résultats encourageants et les données de la littérature nous ont permis de soulever quatre hypothèses initiales : (1) B-B4 représente l'anticorps le mieux adapté au développement de la radioimmunothérapie du myélome multiple (2) La RIT alpha est plus efficace que la RIT bêta dans ce modèle tumoral à cellules isolées (3) La RIT alpha présente une efficacité comparable quelle que soit la lignée de myélome étudiée (4) La RIT alpha présente une efficacité biologique relative supérieure à une irradiation gamma.

#### 4.1.1 Choix de l'anticorps

L'expression de l'antigène ciblé à la surface cellulaire représente non seulement un critère important de sélection du radioélément (*cf.* 1.1.4), mais aussi de l'anticorps ciblant les cellules tumorales (*cf.* 1.3.2). Cette première étape a donc permis de déterminer les caractéristiques de 2 anticorps disponibles au laboratoire, reconnaissant les cellules myélomateuses, B-B4 ciblant syndecan-1 et MA5 ciblant MUC1, à travers des analyses immunohistochimiques et biologiques.

## **4.1.1.1 Analyse des caractéristiques des anticorps B-B4 et MA5**

### **4.1.1.1.1 Analyses immunohistochimiques**

La reconnaissance de différentes lignées et cellules plasmocytaires de patient a été mesurée par cytométrie en flux (cf. Tableau 5). MA5 est reconnu par 43% (3/7) des cellules plasmocytaires normales, 56% (17/30) des cellules de myélome ou de gammopathie monoclonale de signification indéterminées (MGUS) provenant de patients et 100% des lignées cellulaires. B-B4 reconnaît 100% de toutes les cellules de myélome.

La fixation de l'anticorps B-B4 sur les tissus sains humains concerne principalement les cellules urothéliales du rein, les hépatocytes, l'épithélium biliaire, le poumon (alvéoles, bronches et glandes péri-bronchiques) et glandes duodénales. Un marquage cytoplasmique est observé au niveau des tubes rénaux et des cellules musculaires myocardiques.

La fixation de l'anticorps MA5 se retrouve au niveau de la membrane cytoplasmique des cellules urothéliales et tubulaires rénales, au niveau des canaux biliaires ainsi qu'au niveau du poumon (alvéoles, bronches et glandes péri-bronchiques). Un marquage cytoplasmique peu intense est retrouvé sur les fibres musculaires lisses des vaisseaux du rein ainsi qu'au niveau du cœur.

Tableau 5: Caractéristiques des anticorps MA5 et B-B4 : analyse par cytométrie en flux de la reconnaissance de lignées de myélome multiple et de cellules humaines de myélome (A) et analyse histologique de la fixation sur tissus sains (B)

		MA5	B-B4
A Cellules plasmocytaires normales		3/7 (43%)	100 %
MGUS et cellules de MM de patients		17/30 (56 %)	100 %
Lignées cellulaires de MM		3/3(100 %)	100 %
B Rein	Épithélium tubulaire	M	0
	Glomérule	0	0
	Urothélium	M	M
	Muscles lisses des vaisseaux du hile rénal	0	0
Foie	Hépatocytes	0	M
	Endothélium sinusoïde	0	0
	Épithélium biliaire	M	M
Poumon	Épithélium alvéolaire	M	M
	Épithélium bronchique	M	M faible
	Vaisseaux sanguins	0	0
	Glandes péribronchiques	M	M
Duodénum	Épithélium des cryptes	0	M
	Glandes	0	M
	Lymphocytes du chorion	0	M
	Fibres musculaires lisses	0	0
	Vaisseaux sanguins	0	0
Coeur	myocytes	c faible	c

*M = marquage membranaire, c = marquage cytoplasmique*

#### 4.1.1.1.2 Constante d'affinité et nombre de sites épitopiques

L'affinité de l'anticorps MA5 a été mesurée à 9 nM par la méthode de Scatchard.

L'affinité de l'anticorps B-B4 a été mesurée à 1,5 nM. Le nombre de sites est proche de 300 000 pour les 3 lignées cellulaires (Figure 9 et Tableau 6).

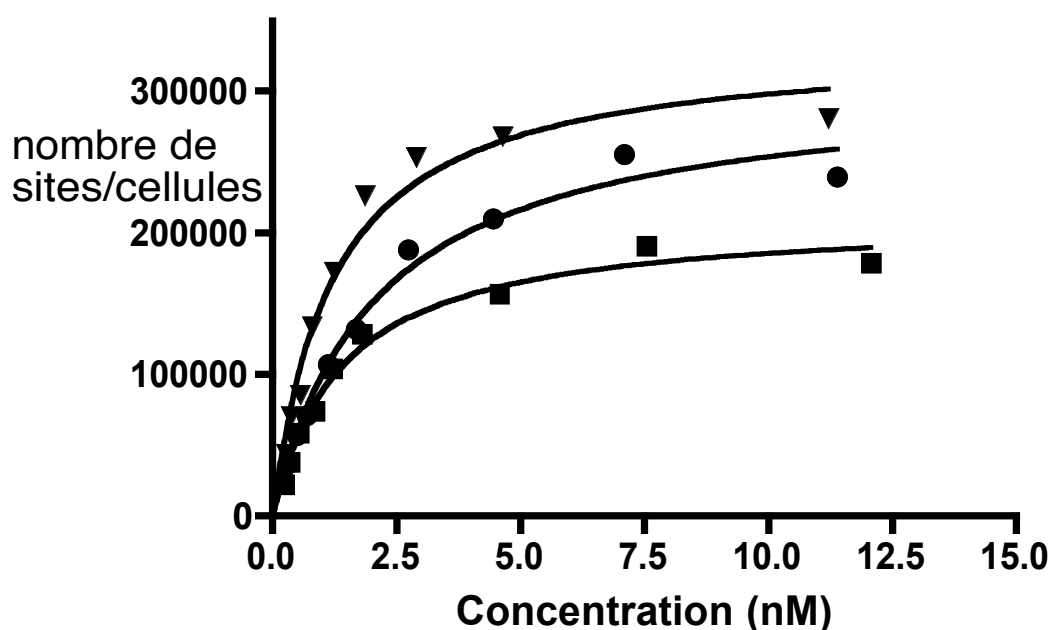


Figure 9 : courbes de Scatchard; LP1 (carré), RPMI 8226 (triangle) et U266 (rond)

Tableau 6 : Nombre de sites de fixation de l'anticorps B-B4

Lignée cellulaire	Nombres de sites par cellule	minimum - maximum
LP1	215700	203600 - 227700
RMPI 8226	356600	329700 - 383500
U266	269400	250700 - 288100

#### 4.1.1.1.3 Internalisation de l'anticorps B-B4

Moins de 5 % de l'anticorps B-B4 est internalisé, ce qui exclut une déhalogénéation de l'anticorps radiomarqué lors du passage de la membrane cytoplasmique (Figure 10).

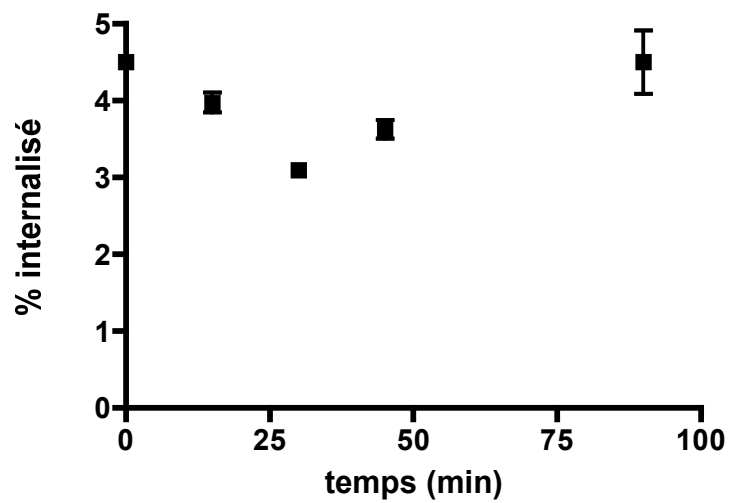


Figure 10 : internalisation de l'anticorps B-B4 marqué à l'iode 131 sur les cellules U266. Le rapport entre l'activité intracytoplasmique (internalisée) et l'activité membranaire (fixée sur la cellule) a été calculé.

## 4.1.1.2 Comparaison des effets des anticorps MA5 et B-B4

### 4.1.1.2.1 Étude de prolifération

Une réduction marquée de la prolifération est observée pour les anticorps B-B4 et MA5 radiomarqué au bismuth 213 en comparaison avec les effets anti-prolifératifs d'un anticorps non spécifique lui aussi radiomarqué à la même activité spécifique de 240 MBq/mg (Figure 11). Cette inhibition de prolifération était plus marquée pour B-B4 que pour MA5 à activité comparable. À haute activité ajoutée (> 200 MBq/l), les effets non spécifiques de l'anticorps témoin sont comparables aux effets du MA5.

% incorporation  
de thymidine tritiée

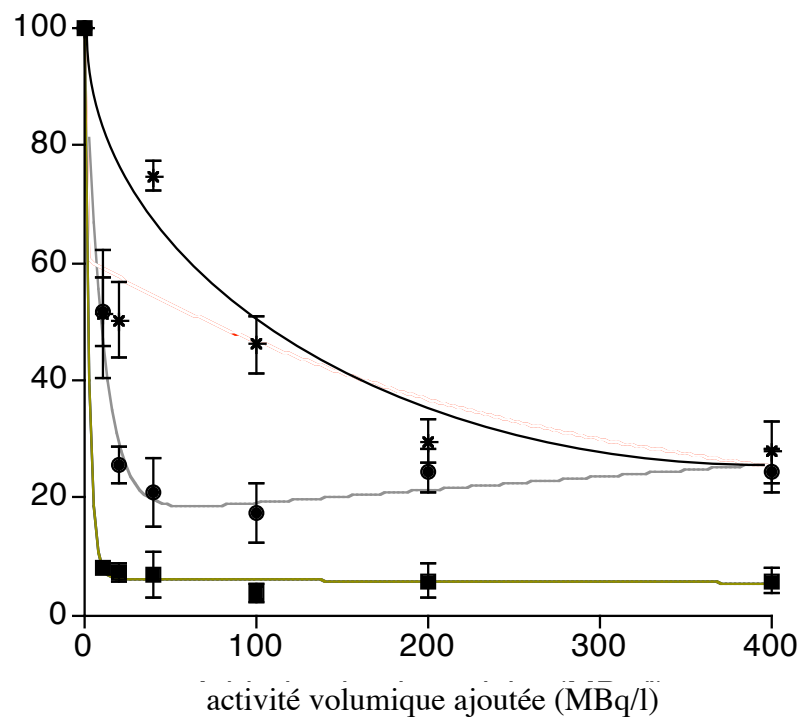


Figure 11: Prolifération cellulaire (test d'incorporation de thymidine tritiée) relative au témoin après 24 heures d'exposition à différents anticorps radiomarqués au bismuth 213 : B-B4 (carrés), MA5 (cercles) et anticorps non spécifique (astérisques)

#### 4.1.1.2.2 Étude du cycle cellulaire

##### 4.1.1.2.2.1 Effets du $^{213}\text{Bi-B-B4}$ à différentes activités spécifiques

Un blocage dans la phase G2-M du cycle cellulaire a été observé précocement (Figure 12). Ce blocage a demeuré stable au-delà de 48 heures pour les concentrations en anticorps les plus élevées ( $\geq 2$  nM). Pour les concentrations plus faibles, le nombre de cellules bloquées en G2-M a diminué au-delà de 24 heures.

% cellules bloquées  
en phase G2-M

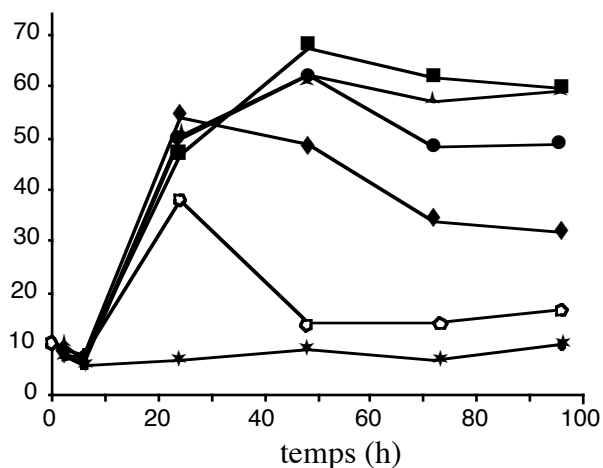


Figure 12 : Arrêt des cellules dans la phase G2-M du cycle cellulaire pour des cellules U266 irradiées à différentes concentrations de  $^{213}\text{Bi-B-B4}$  à une activité spécifique de 400 MBq/mg : 10 nM (carrés), 5 nM (pointes de flèches), 2 nM (cercles pleins), 1 nM (losange), 0,5 nM (cercles vides) et anticorps froid (astérisques),

#### 4.1.1.2.2 Comparaison $^{213}\text{Bi-MA5}$ et $^{213}\text{Bi-B-B4}$

Pour le  $^{213}\text{Bi-B-B4}$ , le blocage en G2-M est apparu précocement (à partir de 24h) et a persisté à des niveaux élevés de plus de 30% (Figure 13). Pour le  $^{213}\text{Bi-MA5}$ , ce blocage est survenu plus tard (à 72 heures) et à des niveaux plus faibles (moins de 30 % de cellules bloquées). Une irradiation non spécifique n'a pas provoqué de blocage significatif.

% cellules bloquées  
en phase G2-M

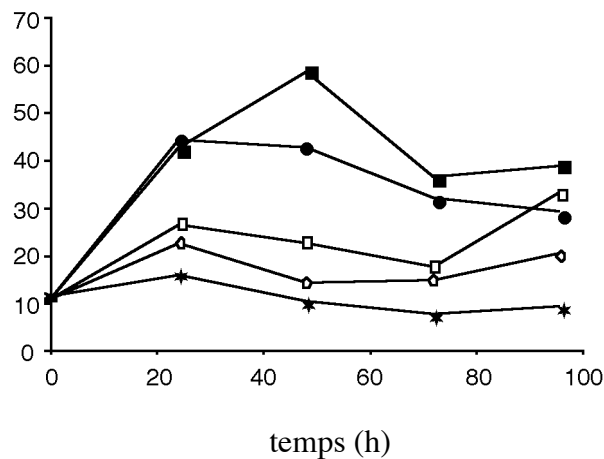


Figure 13 : Arrêt des cellules dans la phase G2-M du cycle cellulaire après irradiation à l'aide de différents anticorps marqués au bismuth 213 à une activité volumique variable : B-B4 à 200 MBq/l (carrés pleins), B-B4 à 40 MBq/l (ronds pleins), MA5 à 200 MBq/l (carrés vides), MA5 à 40 MBq/l (ronds vides) et anticorps non spécifique (astérisques)

À l'issue de cette comparaison, nous avons retenu l'anticorps B-B4 en raison de sa plus grande spécificité vis-à-vis du myélome multiple. Nous avons ensuite abordé l'étape de sélection du radioélément.



## 4.1.2 Comparaison de la RIT alpha avec la RIT bêta

Pour ce modèle tumoral à cellules isolées, les données théoriques permettent de soulever l'hypothèse que la RIT alpha délivrant une énergie importante sur une distance de l'ordre de quelques diamètres cellulaires est plus efficace que la RIT bêta délivrant une énergie plus faible sur une grande distance. Les effets du même anticorps marqué tantôt à l'iode 131 émetteur bêta et le bismuth 213, émetteur alpha, ont été analysés sous différents aspects : activité métabolique, survie clonogénique et cycle cellulaire.

### 4.1.2.1 activité métabolique cellulaire (test au MTT)

À activité volumique équivalente, les effets de l'anticorps B-B4 marqué à l'iode 131 étaient nettement moins marqués que lorsque le même anticorps était marqué au Bismuth 213 (Figure 14).

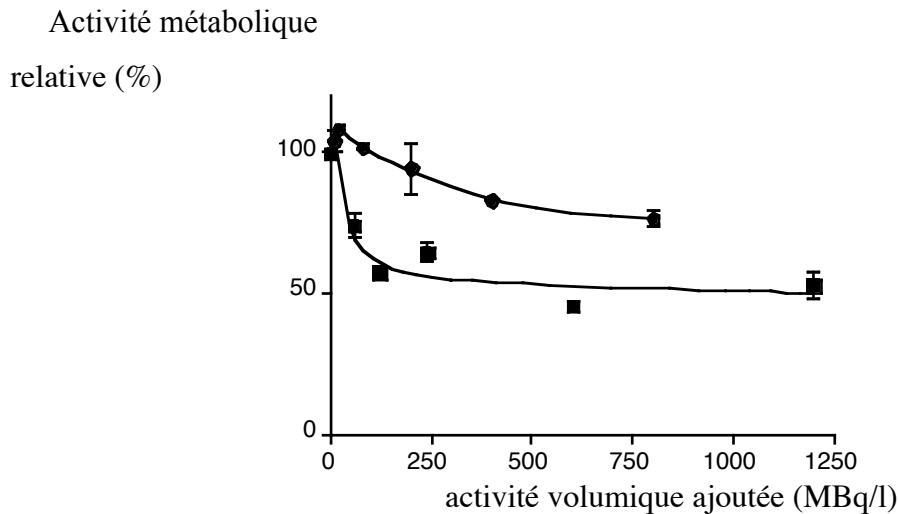


Figure 14 : Effets sur l'activité métabolique (test au MTT) des cellules U266 après 24 heures d'irradiation à l'aide de l'anticorps B-B4 marqué à l'iode 131 (ronds) ou au bismuth 213 (carrés)

### 4.1.2.2 survie clonogénique

Une très nette mortalité après exposition au bismuth 213 a été observée alors qu'après irradiation à l'iode 131, cette mortalité est restée peu élevée, même à fortes activités (Figure 15).

Survie  
clonogénique

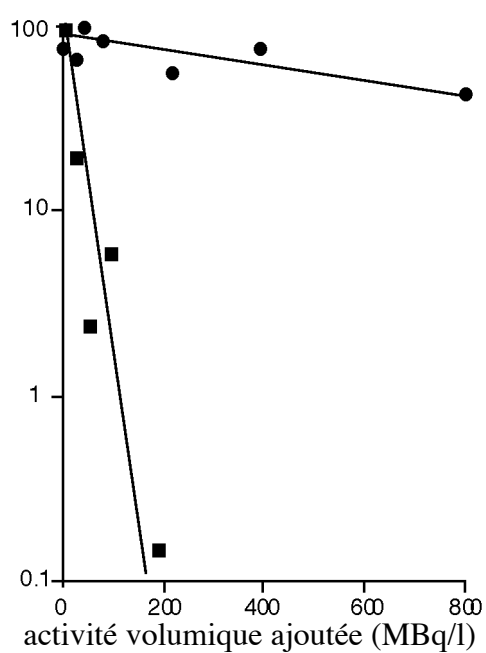


Figure 15 : Survie clonogénique des cellules U266 après 24 heures d'irradiation à l'aide de l'anticorps B-B4 marqué à l'iode 131 (ronds) ou au bismuth 213 (carrés)

### 4.1.2.3 cycle cellulaire

Une très nette et très précoce augmentation des cellules bloquées en phase G2-M a été notée comme précédemment pour les cellules irradiées au bismuth 213, alors que les cellules irradiées à l'iode 131 n'ont présenté qu'un blocage tardif, légèrement supérieur à l'anticorps non spécifique (Figure 16).

% cellules bloquées  
en phase G2-M

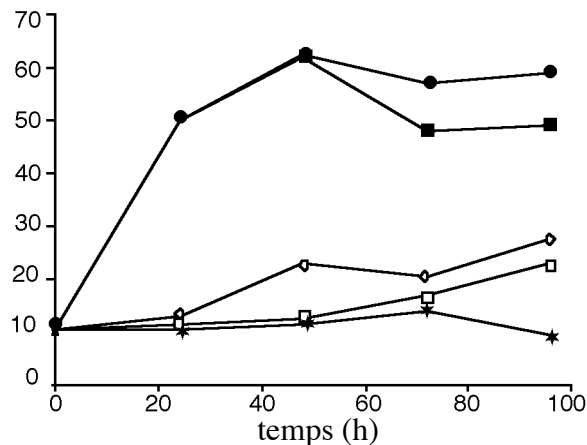


Figure 16 : Blocage cellulaire dans la phase G2-M de cellules U266 irradiées à l'aide de l'anticorps B-B4 marqué : au Bismuth 213 à une activité ajoutée de 600 MBq/l (carrés pleins) et 240 MBq/l (ronds pleins) ou bien à l'Iode 131 à une activité ajoutée de 600 MBq/l (carrés vides) et 200 MBq/l (ronds vides) ou bien exposition des cellules à un anticorps non spécifique non radiomarké (astérisque).

L'hypothèse de la plus grande efficacité de la RIT alpha sur la RIT bêta s'est retrouvée confirmée. Les résultats précédents provenant de l'analyse d'une seule lignée cellulaire, nous avons mesuré les effets de l'irradiation alpha sur 3 lignées différentes de myélome aux caractéristiques différentes (Tableau 3), afin de refléter la variété phénotypiques des myélomes multiples.

### 4.1.3 Effets biologiques de l'anticorps B-B4 marqué au bismuth 213 sur différentes lignées cellulaires

Les effets anti-tumoraux d'une irradiation concernent les différents aspects de la mort cellulaire, qu'elle soit clonogénique, apoptotique ou inhibition de la prolifération. L'objectif de cette partie du travail de thèse était de jeter les bases d'une meilleure compréhension des phénomènes mis en jeu par la radioimmunothérapie alpha en prenant soin de rechercher des différences de réponse entre les 3 lignées de myélome multiple.

#### 4.1.3.1 Survie clonogénique

L'irradiation spécifique des cellules de myélome par le  $^{213}\text{Bi}$ -B-B4 a provoqué une mortalité nettement plus marquée que lors de l'irradiation non spécifique par la BSA radiomarquée au Bismuth 213 (Figure 17).

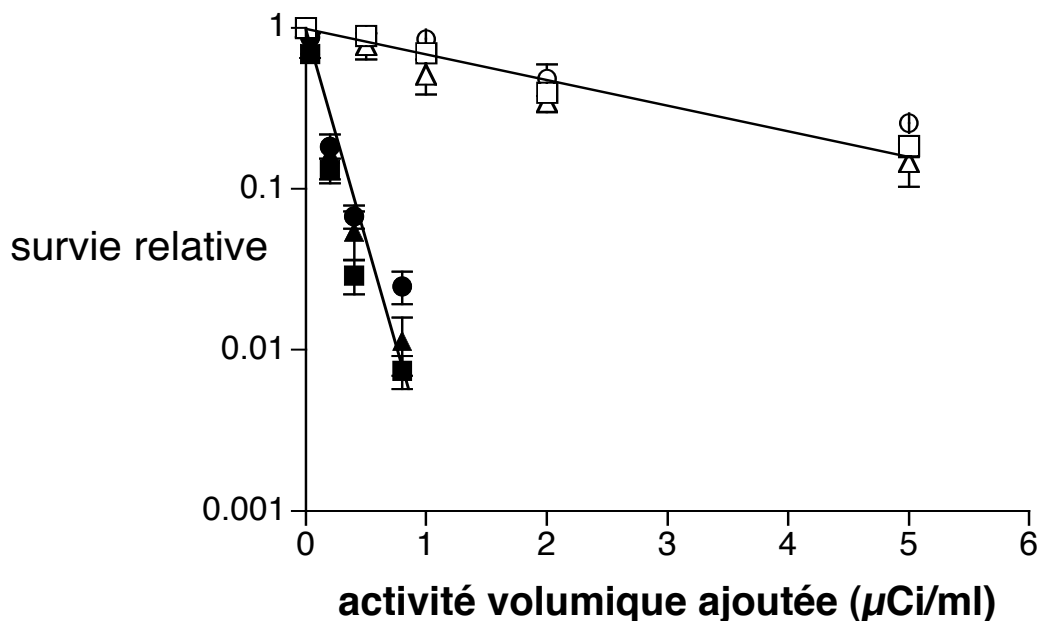


Figure 17: survie clonogénique de 3 lignées de myélome multiple ( LP1 : carré ; RPMI 8226 : triangle ; U266 : rond) après irradiation non spécifique avec la  $^{213}\text{Bi}$ -BSA (formes vides) et spécifique par le  $^{213}\text{Bi}$ -B-B4 (formes pleines)

Parmi les différentes lignées, les effets de la RIT alpha sont sensiblement moins marqués pour la lignée U266 que pour la lignée LP1 ou RPMI 8226, à des concentrations en anticorps équivalentes (différence non significative, Figure 18).

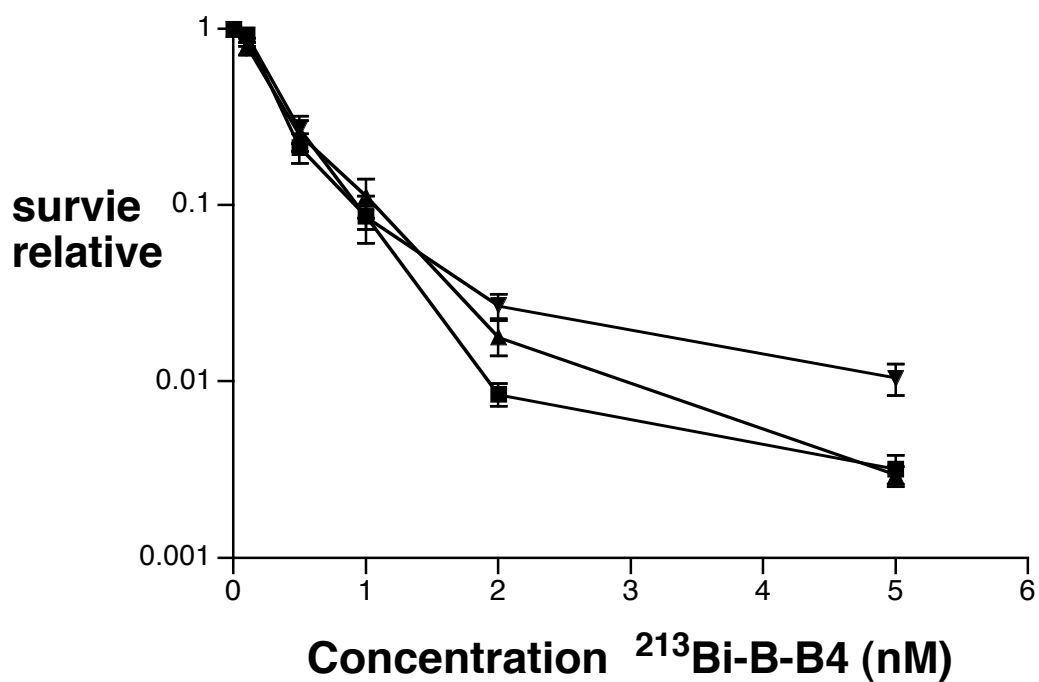


Figure 18 : Survie clonogénique de 3 lignées de myélome multiple : LP1 (carré), RPMI 8226 (triangle), U266 (rond)

### 4.1.3.2 Prolifération

Parmi les différentes lignées, les effets de la RIT alpha étaient nettement plus marqués pour la lignée U266 que pour la lignée LP1 ou RPMI 8226, à des concentrations équivalentes en anticorps (Figure 19). À une concentration de 14,8 MBq/l d'anticorps radiomarqué (1 nM), la prolifération cellulaire était réduite à 20 % comparé à 60% pour U266.

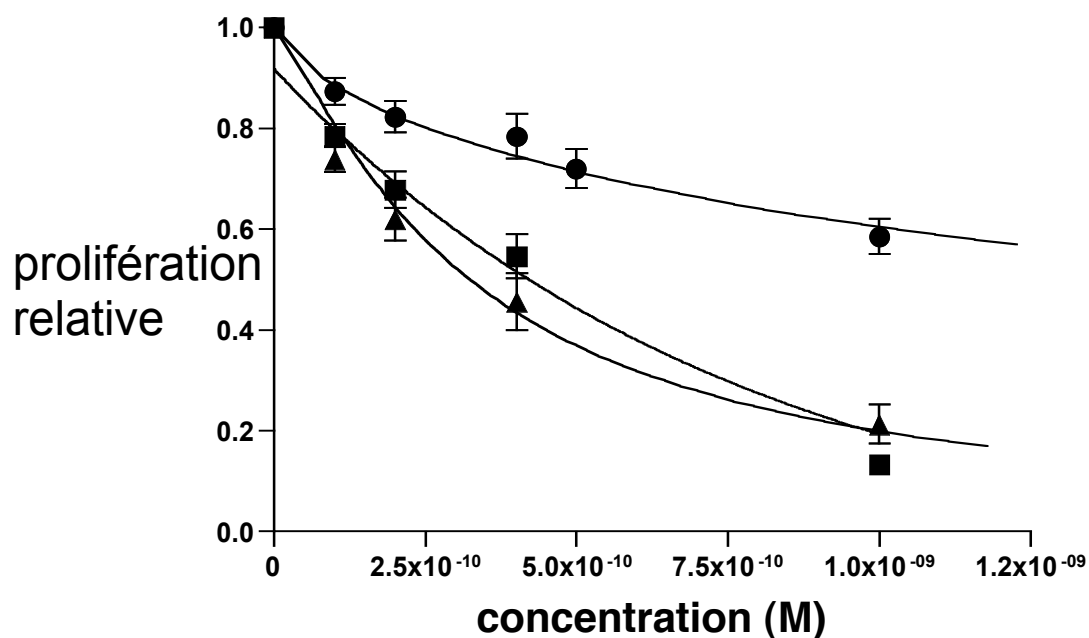


Figure 19 : prolifération cellulaire (test d'incorporation de thymidine tritiée) de 3 lignées de myélome multiple : LP1 (carré), RPMI 8226 (triangle), U266 (rond)

### 4.1.3.3 Cycle cellulaire

À activité ajoutée comparable, le pourcentage de cellules arrêtées dans la phase G2-M du cycle cellulaire était de 50% pour RPMI 8226 et de 20-25% pour les deux autres lignées cellulaires (Figure 20).

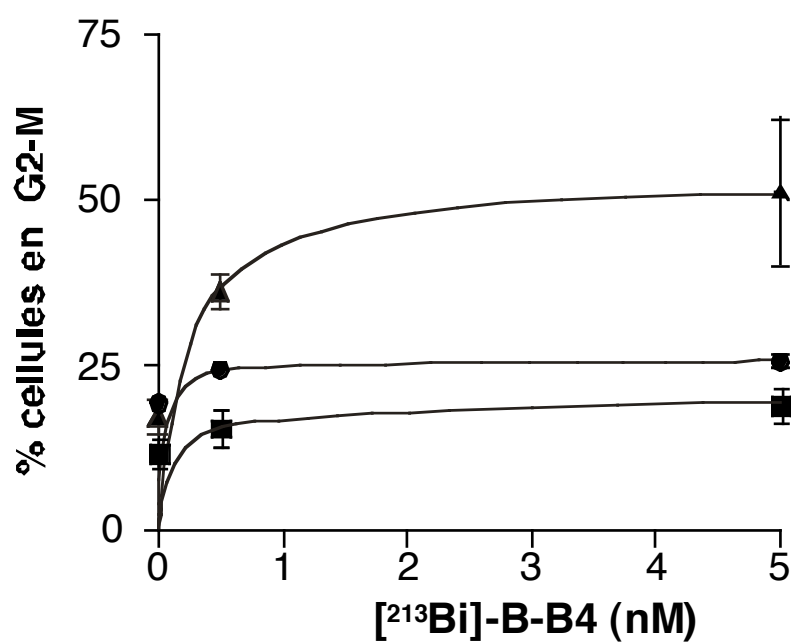


Figure 20 : pourcentage cellules bloquées dans la phase G2-M du cycle cellulaire (marquage à l'iodure de propidium) en fonction de la concentration en anticorps radiomarqué à une activité spécifique de 4 mCi/mg de 3 lignées de myélome multiple : LP1 (carré), RPMI 8226 (triangle), U266 (rond)

#### 4.1.3.4 Apoptose

Le pourcentage de cellules apoptotiques a augmenté en fonction de la dose de radiothérapie. Les lignées cellulaires ont réagi différemment à l'irradiation avec une apoptose marquée pour RPMI 8226 et très faible pour U266 (Figure 21).

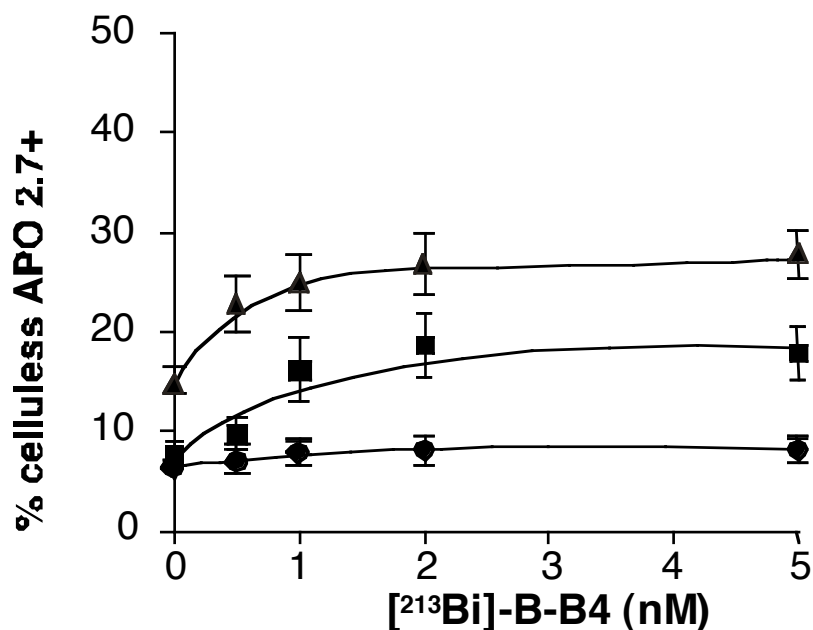


Figure 21: Apoptose (marquage à l'anticorps APO2,7) en fonction de la concentration en anticorps radiomarqué à une activité spécifique de 4 mCi/mg de 3 lignées de myélome multiple : LPI (carré), RPMI 8226 (triangle), U266 (rond)

Une différence de réponse à l'irradiation alpha apparaît, que ce soit en termes de prolifération ou d'apoptose, sans qu'une différence ne soit significative en termes de survie clonogénique. Ces différences peuvent témoigner d'une différence de sensibilité intrinsèque des cellules, mais elles peuvent aussi témoigner plus simplement d'une différence de dose délivrée aux cellules. Nous avons alors déterminé la dose irradiant chaque cellule, en comparant les effets mesurés à ceux d'une irradiation gamma dans le but de calculer l'efficacité biologique relative.



#### 4.1.4 Dosimétrie alpha Comparaison avec une irradiation gamma

Le calcul de l'efficacité biologique relative suppose de comparer les deux types de rayonnements ionisants à la même dose. Une étape de dosimétrie a donc été nécessaire, basée sur les caractéristiques de l'anticorps, et celles des cellules ciblées, dans les conditions expérimentales sélectionnées.

##### 4.1.4.1 Détermination du nombre d'atomes de bismuth à la surface de chaque cellule

Selon la méthode de Stinchcomb<sup>49</sup>, la dose déposée après une irradiation alpha varie en fonction du parcours des particules alpha dans les cellules et de la probabilité d'atteindre le noyau. Une définition précise des caractéristiques cellulaires s'est révélée indispensable. Les 3 lignées de myélome multiple présentent des différences notables de dimensions cytoplasmiques et nucléaires : les cellules LP1 étant les plus volumineuses, et les cellules U266 les plus petites (Tableau 7).

Tableau 7 : Diamètre moyen ( $\mu M$ ) des lignées de myélome multiple

	cytoplasme	noyau	Rapport noyau/ cytoplasme
LP1	19 +/- 4,6	13,9 +/- 3,2	0,73
RPMI 8226	15,4 +/- 3,5	11,5 +/- 2,1	0,76
U266	16,5 +/- 2,6	10,2 +/- 1,8	0,62

Le calcul du nombre d'atomes de bismuth fixé par cellule pour la concentration en anticorps entraînant 50% de mortalité cellulaire à une activité spécifique de 4 mCi/mg, en se basant sur un Kd de 1,5 nM a retrouvé des chiffres compris entre 2 et 5 atomes de bismuth par cellule (Tableau 8).

*Tableau 8 : Nombre d'atomes de bismuth 213 fixé sur chaque cellule de lignée cellulaire différente*

	Concentration de 213Bi-B-B4 (nM)	Nombre d'atomes de bismuth fixé par cellule
LP1	0,18	2,2 à 2,4
RMPI 8226	0,22	4,2 à 4,9
U266	0,25	3,6 à 4,2

Le calcul du nombre d'atome d'iode 131 fixé sur les cellules pour une concentration en anticorps entraînant 50% de mortalité cellulaire à une activité spécifique de 10 mCi/mg, en se basant sur un Kd de 1,5 nM a retrouvé des chiffres proches de 60 atomes d'iode par cellule, soit un rapport de 16 : 1 à 18 : 1.

*Tableau 9 : Nombre d'atomes d'iode 131 fixés à la surface des cellules U266*

	Concentration de 131I-B-B4 (nM)	Nombre d'atomes d'iode fixé par cellule
U266	15	57 à 65

#### 4.1.4.2 Comparaison alpha/gamma en termes de survie clonogénique

Les doses délivrées lors de l'irradiation alpha ont été calculées par la méthode de Stinchcomb en se basant sur les dimensions du noyau, de la cellule, et la concentration en atomes de bismuth radioactifs fixés sur la cellule et en suspension et proches de la cellule.

À partir de ces calculs, les courbes de survie cellulaire sont nettement modifiées, puisque la lignée LP1 devient la plus radiosensible à une irradiation alpha, avec une  $D_0$  de 0,17 Gy, 0,45 et 0,48 Gy pour LP1, RPMI 8226 et U266 respectivement (Figure 22). Par contre, les trois lignées expriment une même radiosensibilité à l'irradiation gamma, avec une  $D_0$  de 1,36, 1,46 et 1,47 Gy pour LP1, RPMI 8226 et U266 respectivement. Le calcul des EBR retrouve des valeurs de 5,53, 2,93 et 2,95 pour LP1, RPMI 8226 et U266 respectivement.

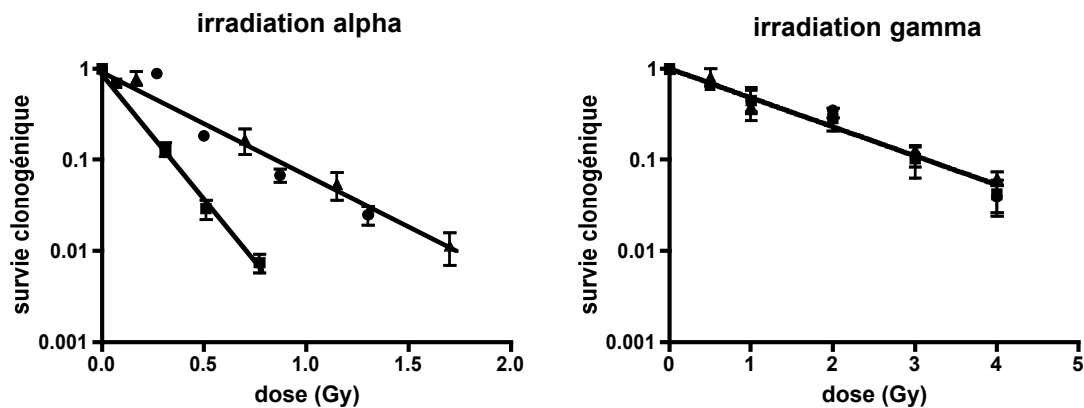


Figure 22 : Courbes de survie clonogénique après correction dosimétrique après traitement par RIT alpha ( $^{213}\text{Bi-B-B4}$ ) et irradiation gamma : LP1 (carré), RPMI 8226 (triangle) et U266 (rond).

### 4.1.4.3 Calcul de l'efficacité biologique relative en rapport avec la prolifération cellulaire

La comparaison à dose équivalente des effets d'une irradiation gamma et d'une irradiation alpha sur les mêmes lignées cellulaires fait apparaître (1) une réduction de la prolifération dans les mêmes proportions que la survie clonogénique, (2) une plus grande participation de l'apoptose dans le cas d'une irradiation alpha (3) qui varie de manière importante en fonction de la lignée cellulaire .

Les courbes de prolifération cellulaire rapportées à la même échelle de dose ont été modélisées selon une décroissance exponentielle avec plateau (Figure 23). Ces courbes ont été modélisées sous la forme d'une décroissance exponentielle avec plateau<sup>148</sup>. Un calcul de l'EBR de l'irradiation alpha par rapport à l'irradiation gamma pour ces données de prolifération retrouve un résultat de 6,01 pour LP1, comparable à l'EBR calculé à partir des courbes de survie clonogénique. Par contre pour U266, l'EBR est de 4,66, ce qui est supérieur à l'EBR calculé à partir des courbes de survie clonogénique.

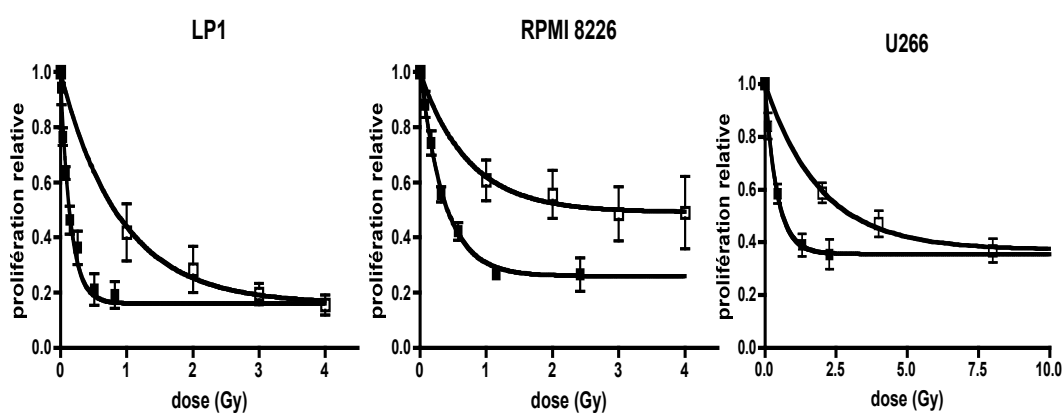


Figure 23 : Prolifération cellulaire (test d'incorporation de thymidine tritiée) 24 heures après irradiation gamma (carrés vides) et irradiation alpha (carrés pleins).

#### 4.1.4.4 Comparaison irradiation alpha/gamma en termes d'induction d'apoptose

L'irradiation alpha engendre une apoptose supérieure à l'irradiation gamma pour les lignées LP1 et RPMI 8226 (Figure 24). Pour la lignée U266 après correction dosimétrique, très peu d'apoptose est générée, que ce soit par irradiation gamma ou alpha.

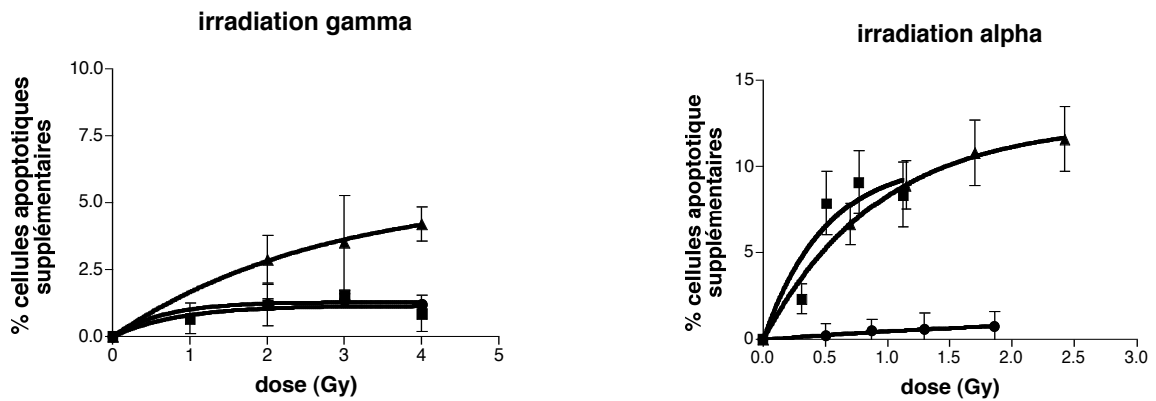


Figure 24 : Apoptose (marquage à l'anticorps anti- apo 2.7 et analyse en cytométrie en flux) après irradiation gamma et irradiation alpha : LP1 (carré), RPMI 8226 (triangle) U266 (rond).

#### 4.1.5 Bilan

Sur les quatre hypothèses initiales, nous avons vérifié que l'anticorps B-B4 représentait l'anticorps le mieux adapté au développement de la radioimmunothérapie du myélome multiple, que la RIT alpha était plus efficace que la RIT bêta dans ce modèle tumoral à cellules isolées et que la RIT alpha présentait une efficacité biologique relative supérieure à un irradiation gamma. Par contre nous avons observé des différences de sensibilité à l'irradiation alpha pour des doses équivalentes, que ce soit en termes de survie cellulaire ou de mécanismes impliqués dans cette mort cellulaire. Cette différence de radiosensibilité à l'irradiation alpha pose la question de l'origine moléculaire de cette radiorésistance d'une part, et de la manière d'augmenter l'efficacité de la RIT alpha d'autre part. Pour ce dernier point, l'expérience clinique et pré-clinique accumulée en radiothérapie externe a démontré qu'il était possible de rendre l'irradiation plus efficace par des interactions synergiques de chimiothérapies avec les rayonnements ionisants. Nous avons alors posé l'hypothèse qu'il était possible d'augmenter la mortalité induite par la RIT alpha en ajoutant des chimiothérapies.

## 4.2 Effets de la RIT alpha combinée avec différentes chimiothérapies

Nous avons retenu des chimiothérapies utilisées dans le traitement du myélome multiple (doxorubicine, dexaméthasone, vinblastine) et/ou connues pour leurs propriétés radiosensibilisantes (doxorubicine, paclitaxel, gemcitabine). Nous avons analysé leur combinaison avec la RIT alpha, en termes d'efficacité tout d'abord, puis en termes de mécanismes impliqués dans leurs interactions avec les particules alpha, pour terminer par l'analyse de la réponse complexe de la RIT alpha avec la gemcitabine.

### 4.2.1 Prolifération des cellules traitées par chimiothérapie seule

La prolifération cellulaire après exposition à différentes concentrations de vinblastine ou de paclitaxel était comparable pour les trois lignées tumorales (Figure 25 et Tableau 10). Par contre la lignée LP1 était moins sensible à la doxorubicine que RPMI 8226 ou U2666. À l'inverse, la lignée LP1 était nettement plus sensible à la dexaméthasone que les deux autres lignées.

*Tableau 10 : concentrations des différentes chimiothérapies inhibant 50% de la prolifération cellulaire*

	concentrations (nM)		
	LP1	RPMI 8226	U266
Dexaméthasone	11	5000	220 000
Doxorubicine	23	10	14
Paclitaxel	2,3	2,3	2,6
Vinblastine	0,07	0,07	0,09

Prolifération  
relative

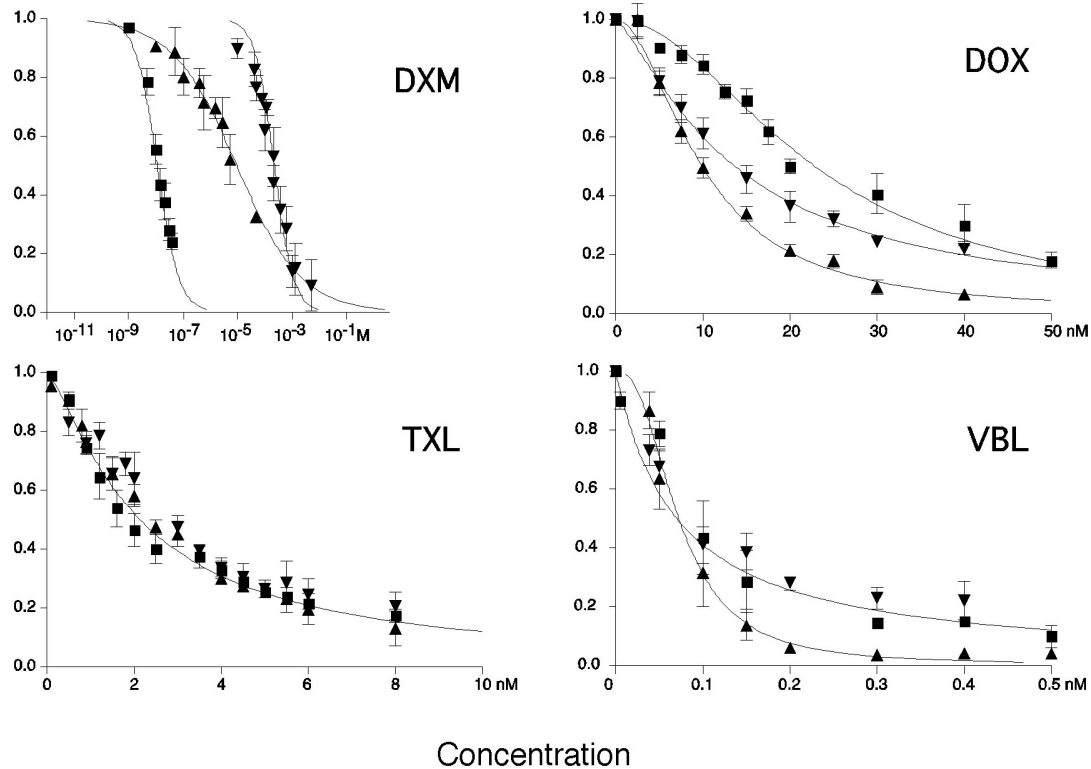


Figure 25 : Prolifération cellulaire (incorporation de thymidine tritiée) en fonction de la concentration en chimiothérapie pour 3 lignées de myélome multiple LP1 (carrés), RPMI 8226 (triangle pointe en haut), U266 (triangle pointe en bas)

Ces courbes de prolifération ainsi que celles obtenues après RIT alpha ont été modélisées sous la forme d'une équation sigmoïde. La combinaison de ces équations selon la méthode de Chou et Talalay<sup>146</sup> permet de calculer un indice de combinaison qui témoigne d'une association synergique (ou supra-additive) entre la RIT alpha et la chimiothérapie associée lorsque cet indice est inférieur à 0,9.



## **4.2.2 Combinaison**

Nous avons sélectionné des concentrations de chimiothérapies entraînant une réduction de la prolifération d'environ 50%, puis combiné ces chimiothérapies avec la RIT alpha selon deux protocoles : 2 heures d'incubation (protocole 1) et 24 heures avant ajout de la RIT alpha (protocole 2). Nous avons appliqué la méthode de Chou Talalay sur les données de prolifération avant de confirmer les résultats en faveur d'un effet supra-additif par des courbes de survie clonogénique et calcul du Radiation Enhancement Ratio (RER) quantifiant précisément l'effet synergique.

### **4.2.2.1 Combinaison RIT alpha et paclitaxel**

Le paclitaxel combiné à la RIT alpha a occasionné une réduction synergique de la prolifération cellulaire (Tableau 11) quel que soit le type d'administration (2 heures ou 24 heures d'incubation). Après incubation de 2 heures de paclitaxel, les indices de combinaison étaient compris entre 0,39 et 0,82 pour la lignée LP1, entre 0,31 et 0,95 pour RPMI 8226 et de 0,50 à 0,79 pour U266. Après incubation de 24 heures avec le paclitaxel, les indices de combinaison étaient compris entre 0,47 et 0,85 pour LP1, entre 0,59 et 0,97 pour RPMI 8226 et entre 0,46 et 0,72 pour U266. Ces données ont été confirmées en survie clonogénique (Figure 26). Une incubation de 36 heures avec 1 nM de paclitaxel a entraîné une survie de 51% des cellules LP1, de 65 % des cellules RPMI 8226 et de 59% des cellules U266. Les RER étaient de 1,66, 1,63 et 1,42 pour LP1, RPMI 8226 et U266 respectivement.

Tableau 11 : combinaison du paclitaxel et de la RIT alpha après incubation de 2 heures (protocole 1) ou 24 h de paclitaxel (protocole 2) et calcul de l'indice de combinaison (IC) selon la méthode de Chou Talalay

	Paclitaxel (nM)	Indice de Combinaison (IC)			
		<sup>213</sup> Bi-B-B4 0,1 nM	0,2 nM	0,5 nM	1 nM
LP 1					
- Protocole 1	0,75	0,82*	0,51	0,43	0,70
	1,00	0,7	0,45	0,39	0,65
	1,25	0,76	0,5	0,45	ND
- Protocole 2	0,75	0,85	0,84	ND	ND
	1,00	0,47	0,60	0,80	0,67
	1,25	0,57	0,54	ND	ND
	1,75	ND	ND	0,66	0,77
	3,00	ND	ND	0,72	0,75
RPMI 8226					
- Protocole 1	0,60	ND	0,87	0,32	0,36
	1,00	ND	0,95	0,31	0,37
- Protocole 2	1,00	ND	0,70	0,70	0,68
	1,75	ND	0,84	0,76	0,69
	3,00	ND	0,97	0,61	0,59
U266					
- Protocole 1	1,00	0,62	0,52	0,54	0,50
	1,25	0,76	0,54	0,66	ND
	1,75	ND	ND	0,79	0,56
- Protocole 2	1,00	0,46	0,59	0,57	0,49
	1,25	0,52	0,63	0,72	ND
	1,75	ND	ND	0,64	0,53
	3,00	ND	ND	0,64	0,58

ND, non déterminé;  $IC < 0,9$ ,  $0,9 \leq IC \leq 1,1$ , et  $IC > 1,1$  indiquent une combinaison synergique, additive, et antagoniste, respectivement,  
Effet synergique après calcul d'interaction mutuellement exclusive, et absence d'effet synergique après calcul en interaction non mutuellement exclusive.

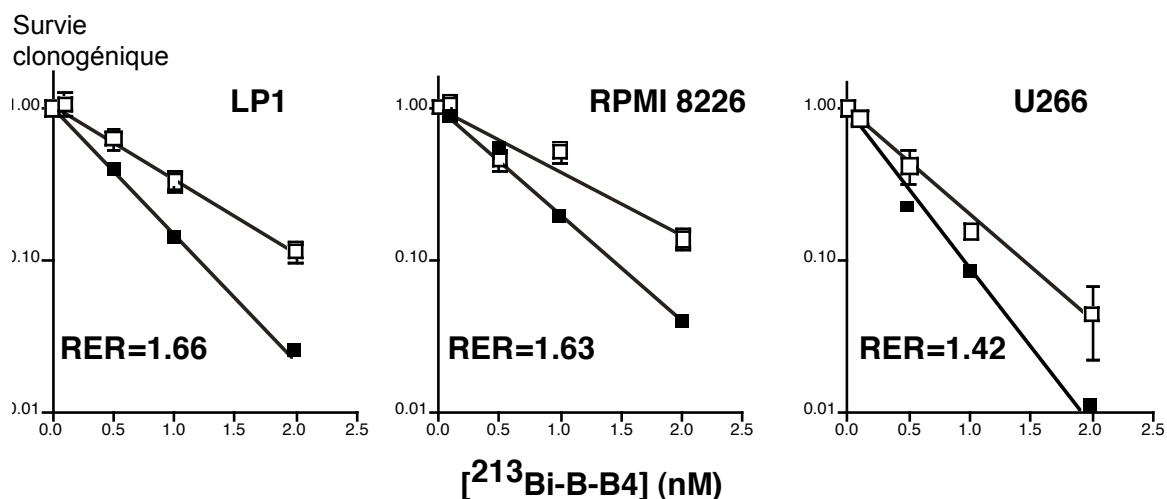


Figure 26 : survie clonogénique après traitement par RIT alpha à une activité spécifique de 4 mCi/mg (carrés vides) ou RIT alpha combiné à 1 nM de paclitaxel (carrés pleins). Activité spécifique de 96 MBq/mg pour LP1, 150 MBq/mg pour RPMI 8226, et 120 MBq/mg pour U266.

#### 4.2.2.2 Combinaison RIT alpha et doxorubicine

L'association de la doxorubicine avec la RIT alpha a permis une réduction modérément synergique de la prolifération des trois lignées après une incubation de 24 heures (Tableau 12). Les indices de combinaisons étaient compris entre 0,58 et 0,81 pour LP1, entre 0,58 et 0,73 pour RPMI 8226 et entre 0,42 et 0,76 pour U266. Après incubation courte de 2 heures, l'association de la doxorubicine à la RIT alpha était principalement additive simple. Les indices de combinaisons étaient compris entre 0,74 et 1,21 pour LP1, entre 0,77 et 1,21 pour RPMI 8226 et entre 0,65 et 1,32 pour U266. Les courbes de survie cellulaire après une incubation de 24 heures de doxorubicine ont confirmé une synergie faible avec la RIT alpha (Figure 27). Une concentration de 10 nM de doxorubicine a entraîné une mortalité cellulaire de près de 60 % pour les 3 lignées (survie de 45% ; 30% et 35% pour LP1, RPMI 8226 et U266 respectivement). Les RER correspondant pour chaque lignée cellulaire étaient de 1,17, 1,20 et 1,19.

Tableau 12 : Combinaison de la doxorubicine et de la RIT alpha après incubation de 2 heures (protocole 1) ou 24 h de chimiothérapie (protocole 2) et calcul de l'indice de combinaison (IC) selon la méthode de Chou Talalay

	Doxorubicine (nM)	Indice de Combinaison (IC)		
		<sup>213</sup> Bi-B-B4 0,1 nM	0,2 nM	0,4 nM
LP 1				
- Protocole 1	10	1,08	1,00	0,94
	15	0,91	0,74	0,88*
	20	1,11	1,21	1,06
- Protocole 2	10	0,81	0,80	0,80
	15	0,66	0,58	0,68
	20	0,73	0,58	0,59
RPMI 8226				
- Protocole 1	5	1,21	1,07	0,89*
	7,5	1,03	1,10	0,93
	10	0,77*	1,06	1,00
- Protocole 2	5	0,73	0,73	0,64
	7,5	0,65	0,64	0,58
	10	0,71	0,68	0,69
U266				
- Protocole 1	5	1,32	0,65	0,86*
	7,5	1,24	0,81*	1,11
	10	0,74	0,69	0,88*
- Protocole 2	7,5	0,72	0,59	0,66
	10	0,56	0,44	0,42
	15	0,76	0,47	0,63

IC < 0,9, 0,9 ≤ IC ≤ 1,1, et IC > 1,1 indiquent une combinaison synergique, additive, et antagoniste, respectivement,

Effet synergique après calcul d'interaction mutuellement exclusive, et absence d'effet synergique après calcul en interaction non mutuellement exclusive.

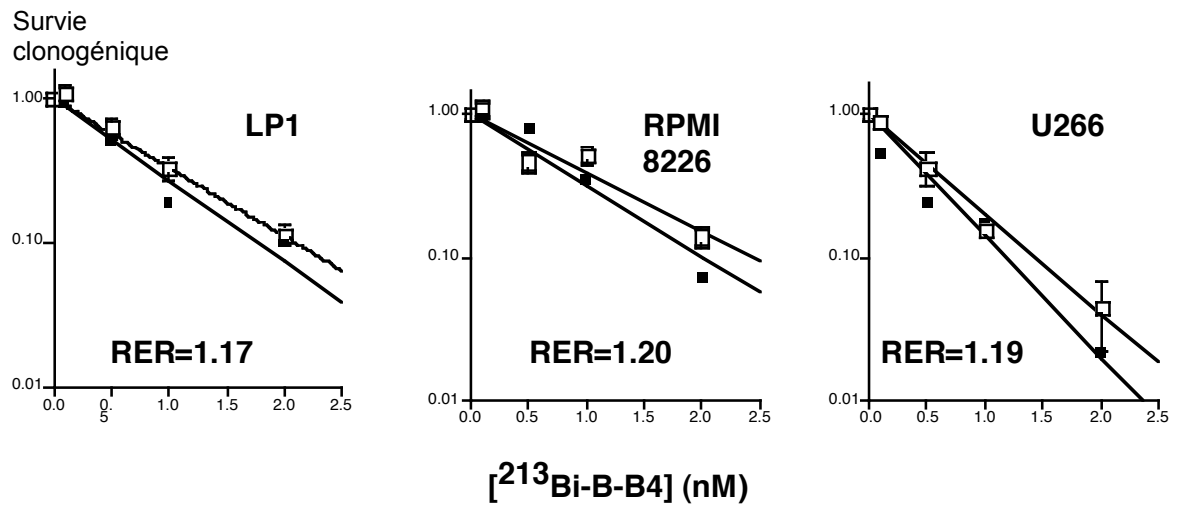


Figure 27 : survie clonogénique après traitement par RIT alpha à une activité spécifique de 4 mCi/mg (carrés vides) ou RIT alpha combiné à 10 nM de doxorubicine (carrés pleins). Activité spécifique de 96 MBq/mg pour LP1, 150 MBq/mg pour RPMI 8226, et U266.

### 4.2.2.3 Combinaison RIT alpha et dexamethasone

La dexamethasone combinée avec la RIT alpha a provoqué une réduction additive de la prolifération pour LP1 et U266, et une réponse principalement mutuellement antagoniste pour la lignée RPMI 8226 (Tableau 13). Après une incubation de 24 heures, les indices de combinaison étaient compris entre 0,77 et 1,04 pour LP1, entre 0,83 et 1,83 pour RPMI 8226 et entre 0,87 et 1,05 pour U266.

*Tableau 13 : combinaison de la dexamethasone et de la RIT alpha après incubation de 2 heures (protocole 1) ou 24 h de chimiothérapie (protocole 2) et calcul de l'indice de combinaison (IC) selon la méthode de Chou Talalay*

		Indice de Combinaison (IC)		
		<sup>213</sup> Bi-B-B4		
		0,1 nM	0,2 nM	0,4 nM
LP1				
- Protocole 2	10 nM	0,79*	0,91	1,04
	15 nM	0,77*	0,81*	1,02
	20 nM	0,85*	0,85*	1,02
RPMI 8226				
- Protocole 2	0,5 µM	0,83*	1,08	1,06
	1 µM	1,75	1,66	0,93
	1,5 µM	1,83	1,21	0,96
U266				
- Protocole 2	0,1 mM	0,96	0,88*	1,04
	0,2 mM	0,89*	0,87*	1,00
	0,4 mM	1,02	0,93	1,05

IC < 0,9, 0,9 ≤ IC ≤ 1,1, et IC > 1,1 indiquent une combinaison synergique, additive, et antagoniste, respectivement,  
Effet synergique après calcul d'interaction mutuellement exclusive, et absence d'effet synergique après calcul en interaction non mutuellement exclusive,

#### **4.2.2.4 Combinaison RIT alpha et vinblastine**

La vinblastine combinée à la RIT alpha a donné lieu à une réponse mutuellement antagoniste pour les 3 lignées cellulaires avec des indices de combinaisons proches ou supérieurs à 1 (Tableau 14). Après incubation de 2 heures, les indices de combinaisons étaient compris entre 0,82 et 2,42 pour LP1, entre 0,94 et 2,77 pour RPMI 8226 et entre 0,73 et 2,42 pour U266. Après incubation de 24 heures, les IC étaient compris entre 1,05 et 2,64 pour LP1, entre 0,58 et 1,39 pour RPMI 8226 et entre 0,77 et 2,41 pour U266.

Tableau 14 : Combinaison de la vinblastine et de la RIT alpha après incubation de 2 heures (protocole 1) ou 24 h de chimiothérapie (protocole 2) et calcul de l'indice de combinaison (IC) selon la méthode de Chou Talalay

	Vinblastine (nM)	Indice de Combinaison (IC)		
		<sup>213</sup> Bi-B-B4		
		0,1 nM	0,2 nM	0,4 nM
LP 1				
- Protocole 1	0,025	2,42	1,10	0,82*
	0,050	1,54	1,81	2,30
	0,100	1,13	1,28	1,26
	0,150	1,02	1,12	1,15
- Protocole 2	0,025	2,44	2,36	2,64
	0,035	1,05	1,38	1,40
	0,050	1,46	1,40	1,30
RPMI 8226				
- Protocole 1	0,025	1,25	0,94	0,98
	0,035	1,17	1,04	1,00
	0,050	2,77	2,32	2,69
	0,100	1,40	1,60	1,74
- Protocole 2	0,025	0,88	0,78*	0,58
	0,050	1,39	1,27	0,94
U266				
- Protocole 1	0,025	2,42	1,51	1,63
	0,035	0,98	0,73*	1,34
	0,050	1,12	1,37	2,11
	0,100	1,16	1,05	1,19
	0,150	1,72	1,39	1,94
- Protocole 2	0,025	2,41	2,09	1,78
	0,035	0,77*	1,32	1,51
	0,050	0,92	1,03	1,06

IC < 0,9, 0,9 ≤ IC ≤ 1,1, et IC > 1,1 indiquent une combinaison synergique, additive, et antagoniste, respectivement,

Effet synergique après calcul d'interaction mutuellement exclusive, et absence d'effet synergique après calcul en interaction non mutuellement exclusive



Ainsi la combinaison paclitaxel et RIT alpha était fortement synergique sur la mortalité cellulaire quelle que soit la séquence d'administration 2 ou 24 heures, alors que la combinaison doxorubicine et RIT alpha après une incubation de 24 heures avant irradiation était faiblement synergique, et simplement additive après 2 heures d'incubation. Notre hypothèse de départ supposant qu'une association RIT alpha et chimiothérapies anti-mitotiques pouvait être supra-additive se retrouve donc vérifiée. Cette synergie est observée quelle que soit la sensibilité initiale à la chimiothérapie ou la RIT alpha. Par contre, aucun effet synergique n'est retrouvé avec la vinblastine ou la dexaméthasone pour les 3 lignées

Différents mécanismes ont été évoqués pour expliquer la radiosensibilisation par les chimiothérapies anti-mitotiques d'une irradiation gamma, comme les interactions avec l'apoptose, le cycle cellulaire, les réparations ou l'induction de lésions de l'ADN radioinduites.... Nous avons recherché si ces mêmes mécanismes s'appliquaient à l'interaction avec la RIT alpha.

### **4.2.3 Mécanismes de l'effet synergique de la RIT alpha avec le paclitaxel ou la doxorubicine**

Les effets synergiques entre les chimiothérapies anti-mitotiques et une irradiation X ou gamma sont expliqués par de multiples phénomènes. Trois mécanismes principaux ont été étudiés : interaction avec le cycle cellulaire, étude des cassures de l'ADN radioinduites, et analyse de l'apoptose.

#### **4.2.3.1 Effets du paclitaxel et de la doxorubicine sur le cycle cellulaire**

Nous avons décidé de mesurer les effets du paclitaxel et de la doxorubicine sur le cycle cellulaire entre 2 et 24 heures d'incubation (Figure 28). Le paclitaxel à faible dose (nM) a provoqué une redistribution majeure dans le cycle cellulaire. Les cellules exposées à des concentrations croissantes de paclitaxel se sont accumulées dans la phase G2-M du cycle cellulaire pour les 3 lignées cellulaires, atteignant un pic après 24 heures avec plus de 50% des cellules dans cette phase du cycle cellulaire (pour 1 nM paclitaxel : 80,3%, 64,5% et 52,5 % de cellules arrêtées dans la phase G2-M pour LP1, RPMI 8226 et U266 respectivement). Cette accumulation est apparue dès 2 heures pour LP1, et RPMI 8226 (LP1: témoin 15,2 % vs 12,1% à 2 nM,  $p=0,042$ ; RPMI 8226: témoin 18,4% vs 22,2%,  $p=0,008$ ; U266 : témoin 15,8% vs 2 nM 15,9%, NS), mais après 4 heures une proportion importante des cellules LP1 où RPMI 8226 étaient accumulées dans la phase G2-M alors que les cellules U266 demeuraient quasiment inchangées (témoin: 10,5 %; 1 nM: 11,8% et 2 nM: 12,9 %). Après 6 heures, toutes les lignées présentaient une accumulation en G2-M, mais dans une proportion moindre pour U266 que pour LP1 ou RPMI 8226.

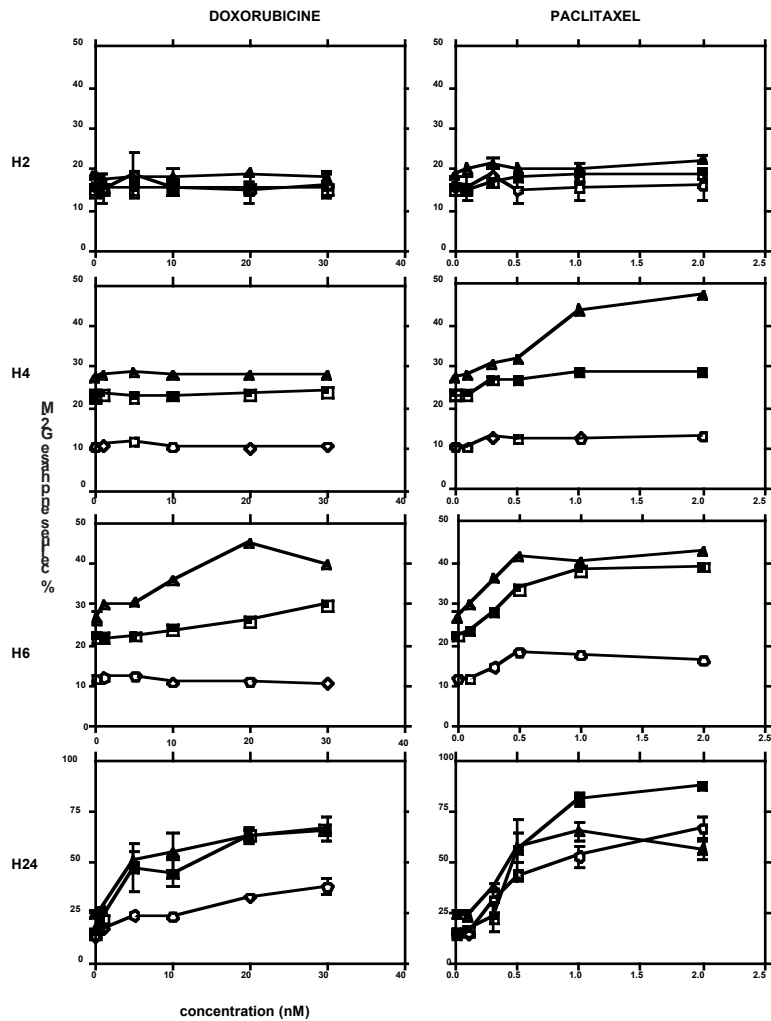


Figure 28 : Effets de la doxorubicine et du paclitaxel sur le cycle cellulaire (pourcentage de cellules en phase G2-M après marquage à iodure de propidium); lignées cellulaires LP1 (carrés), RPMI 8226 (triangle), U266 (rond)

Les cellules exposées à la doxorubicine présentaient un blocage dans la phase G2-M du cycle cellulaire plus lentement qu'après exposition au paclitaxel, puisque cet arrêt n'est survenu qu'après une incubation de 6 heures pour LP1 et RPMI 8226. Après 24 heures d'incubation, les trois lignées cellulaires présentaient un blocage en phase G2-M, mais à un niveau plus élevé pour LP1 ou RPMI 8226 que pour U266.

### 4.2.3.2 Effets de la vinblastine sur le cycle cellulaire

Aucune accumulation des cellules dans la phase G2-M du cycle cellulaire n'est observée après administration des doses de vinblastine entraînant une réduction marquée de la prolifération cellulaire (Figure 29).

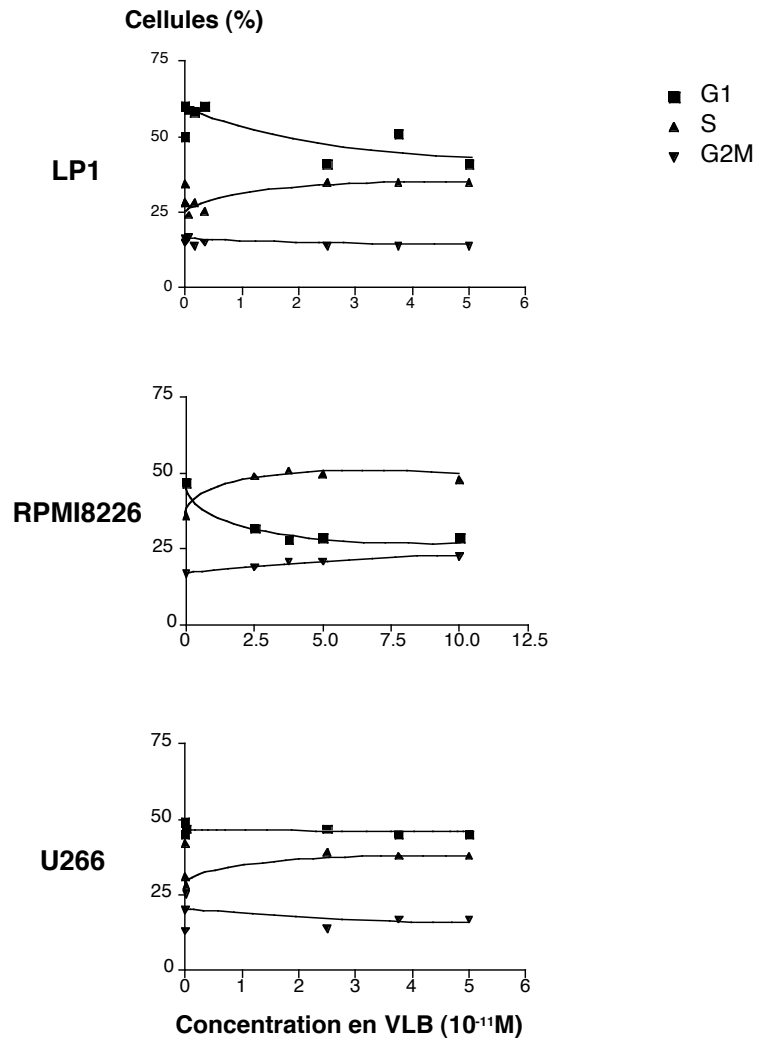


Figure 29 : Effets de vinblastine sur le cycle cellulaire après marquage à iodure de propidium : cellules en phase G1 (carré), S (triangle point en haut) et G2-M (triangle pointe en bas)

### 4.2.3.3 Implications des cassures de l'ADN

Nous avons retenu la dose de 10 nM de doxorubicine pour laquelle un effet synergique avec la RIT alpha a été précédemment montré.

Étant donné que certaines associations synergiques entre chimiothérapie et irradiation par photons X ou gamma sont expliqués par une augmentation des lésions de l'ADN radioinduites<sup>149,150</sup>, mais que le paclitaxel n'induit pas de lésion de l'ADN mais plutôt stabilise la polymérisation des microtubules<sup>94</sup>, nous n'avons retenu que l'étude des dommages de l'ADN après traitement combiné de doxorubicine et de RIT alpha. Le test des comètes en milieu alcalin a été retenu, car il permet de mesurer tous les types de dommages radioinduits, à la fois simple et double brin.

Après une incubation de 12 heures avec le <sup>213</sup>Bi-CHX-A-DTPA-B-B4, il était mesuré plus de cassures de l'ADN pour RPMI 8226 que pour le témoin (relative Tail DNA: 1,95 +/- 0,32, p=0,02, Figure 30), alors que pour LP1 ou U266, aucune différence n'était notée (relative Tail DNA: 1,15 +/- 0,35, 1,04 +/- 0,48 pour LP1 et U266 respectivement). Après exposition à la doxorubicine seule pendant 36 heures, il était mesuré légèrement plus de cassures de l'ADN pour RPMI 8226 que pour le témoin sans que cela n'atteigne le seuil de significativité (relative Tail DNA: 1,30 +/- 0,25, 1,17 +/- 0,5, 0,78 +/- 0,29 pour RPMI 8226, LP1, U266 respectivement). Enfin, les cellules exposées à un traitement combiné de doxorubicine suivie de RIT alpha présentaient un plus fort taux de cassures de l'ADN pour RPMI 8226 (relative Tail DNA: 2,86 +/- 0,3) en comparaison avec la doxorubicine seule (p=0,028) ou la RIT alpha seule (p=0,05), ce qui n'était pas le cas pour LP1 ou U266 ( LP1: 1,47 +/- 1,1, U266: 1,15 +/- 0,6).

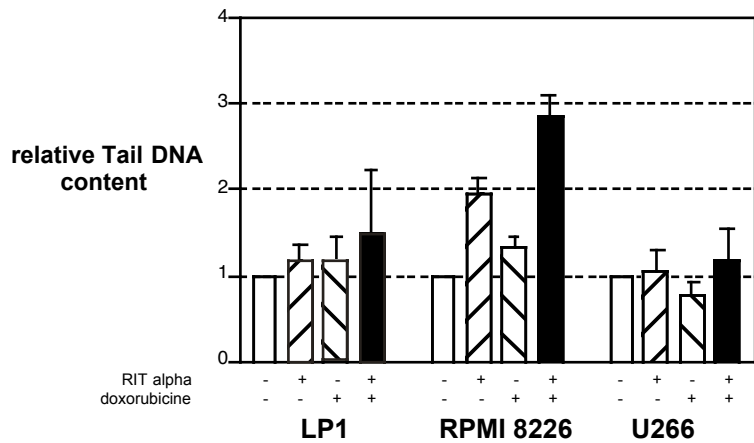


Figure 30: effets de la doxorubicine combinée à la RIT alpha sur les cassures de l'ADN (mesure du relative Tail DNA content par la techniques des comètes).

#### 4.2.3.4 Effets sur l'apoptose du paclitaxel et de la doxorubicine combinés avec la RIT alpha

En comparaison avec le témoin, la RIT alpha a provoqué une apoptose marquée avec LP1 (18% vs. 8%,  $p < 0,001$ , Figure 31), ou RPMI 8226 (27% vs. 15%,  $p < 0,001$ ), mais à des taux faibles pour U266 (8 vs. 6%, NS). Le paclitaxel a induit un plus fort taux d'apoptose (21%, 41% et 15% pour LP1, RPMI 8226 et U266 respectivement) que la doxorubicine (13%, 24% et 8% pour LP1, RPMI 8226 et U266 respectivement) à des concentrations donnant la même mortalité cellulaire. Ni la RIT alpha, ni la doxorubicine n'ont induit d'apoptose significative pour U266, alors que le paclitaxel a doublé le nombre de cellules U266 en apoptose (témoin: 6,2% vs paclitaxel 1 nM: 15%,  $p = 0,015$ ).

Aucune différence significative n'a été notée entre le paclitaxel ou la RIT alpha seuls en comparaison avec les mêmes produits en association (LP1: 20,6% vs 17,8% vs 25,4%, NS pour paclitaxel, RIT alpha, et traitement combiné respectivement; RPMI 8226: 40,3% vs 27,6% vs 36,4%, NS; U266: 14,7 vs 15,0% vs 8,1%, NS). De la même manière, aucune différence significative n'était notée entre la doxorubicine ou la RIT alpha seules, en comparaison avec les mêmes produits en association (LP1: 12,7 % vs 17,8% vs 20,1%, NS pour doxorubicine, RIT alpha, et traitement combiné respectivement; RPMI 8226, 23,7% vs 27,6% vs 32,7%, NS; U266: 7,7% vs 8,1% vs 9,2%, NS).

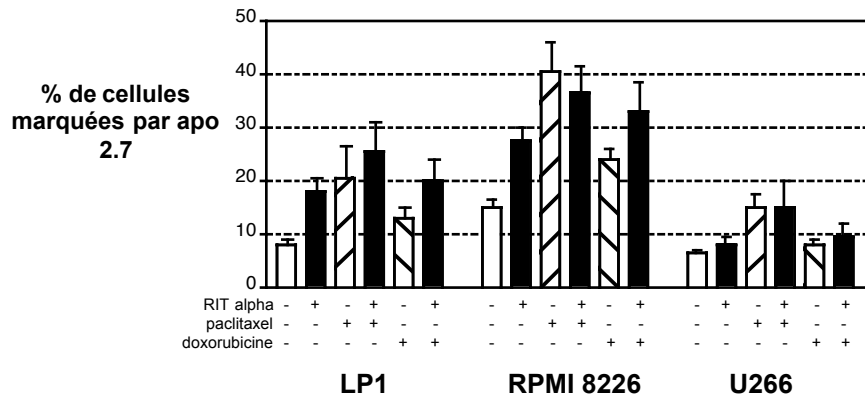


Figure 31 : effets de la doxorubicine et du paclitaxel combinés à la RIT alpha sur l'apoptose (mesure par cytométrie en flux du pourcentage de cellules marquées par l'anticorps apo 2.7).

Ainsi, les effets synergiques entre la RIT alpha et le paclitaxel ou la doxorubicine trouvent une partie de leur explication dans les interactions avec le cycle cellulaire et les cassures radioinduites de l'ADN, mais pas avec l'apoptose.

De manière comparable, nous avons étudié les interactions de la gemcitabine avec la RIT alpha en comparaison avec l'irradiation externe par rayonnements gamma.

## **4.2.4 Association de la RIT alpha avec la gemcitabine**

La gemcitabine est un agent pharmacologique particulièrement radiosensibilisant avec les rayonnements gamma. Nous avons recherché dans un premier temps l'existence d'un effet synergique avec les deux types de rayonnements ionisants alpha et gamma avant de détailler les mécanismes potentiellement impliqués dans la radiosensibilisation observée.

### **4.2.4.1 Étude de la prolifération, de la survie et du cycle cellulaire après exposition à la gemcitabine**

Tout d'abord, nous avons mesuré la sensibilité des 3 lignées de myélome multiple à la gemcitabine, à travers l'analyse de la prolifération, de la survie clonogénique et du cycle cellulaire (Figure 32 et Tableau 15). Après 24h d'exposition à la gemcitabine, il n'est pas retrouvé de différence de prolifération (Figure 1A), ni de différence de survie clonogénique entre les 3 lignées. De même, les trois lignées présentent une accumulation de plus de 70% en phase S précoce (Figure 1B), d'amplitude comparable pour des concentrations proches de 10 nM.



Tableau 15 : Effets de la gemcitabine (GMZ) sur la prolifération, la survie clonogénique et le cycle cellulaire sur 3 lignées de myélome multiple.

	LP1			RPMI 8226			U266				
	GMZ (nM)			GMZ (nM)			GMZ (nM)				
Prolifération (%)	10	62.0±8.8			10	60.5±4.9			10	54.2±5.9	
survie clonogénique (%)	10	71.9±19.5			10	67.3±4.8			10	56.7±22	
Répartition dans le cycle cellulaire (%)		G1	S	G2M	G1	S	G2M	G1	S	G2M	
0		48.5±3.5	38±1.4	13.5±2.1	32.5±0.7	49±2.8	18.5±2.1	48±5.7	39.5±6.4	12.5±0.7	
5		21.5±2.1	69.5±0.7	9±2.8	7±1.4	84.5±4.9	8.5±3.5	13±1.4	84±4.2	3±2.8	
6		20±5.7	69.5±7.8	10.5±2.1	7±1.4	88±2.8	5±1.4	10±1.4	84.5±0.7	5.5±0.7	
7		24.5±6.4	70.5±4.9	5±1.4	8.5±0.7	88±1.4	3.5±0.7	9.5±4.9	86.5±4.9	4±0.0	

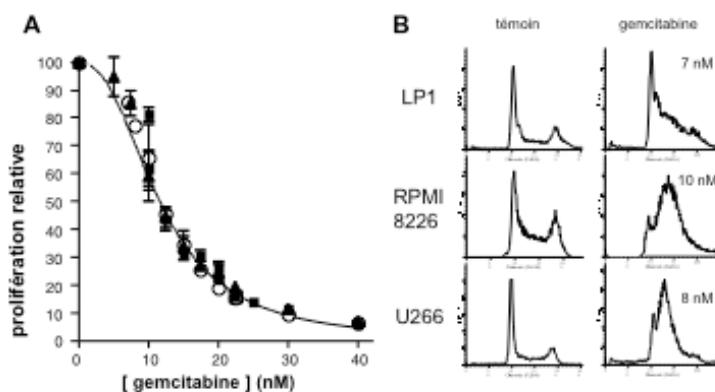


Figure 32 : A : prolifération cellulaire (test d'incorporation de thymidine tritiée) et B : modification du cycle cellulaire (analyse en cytométrie en flux après incorporation d'iodure de propidium) après exposition à différentes concentrations de gemcitabine

#### 4.2.4.2 Combinaison avec la gemcitabine

Les effets radiosensibilisants de la gemcitabine ont ensuite été mesurés en comparant 2 types de rayonnements : gamma et alpha (Figure 33). Pour ce qui concerne une irradiation gamma, nos résultats montrent un effet radiosensibilisant synergique de la gemcitabine pour les lignées LP1 et U266 avec des RER comparables de 1,55 et 1,49 respectivement. Par contre la lignée RPMI 8226 n'est pas radiosensibilisée par la gemcitabine. Pour ce qui concerne une irradiation par les particules alpha de l'anticorps B-B4 marqué au bismuth 213, aucun effet synergique n'est noté pour les 3 lignées, voire un effet infra-additif pour la lignée RPMI 8226.

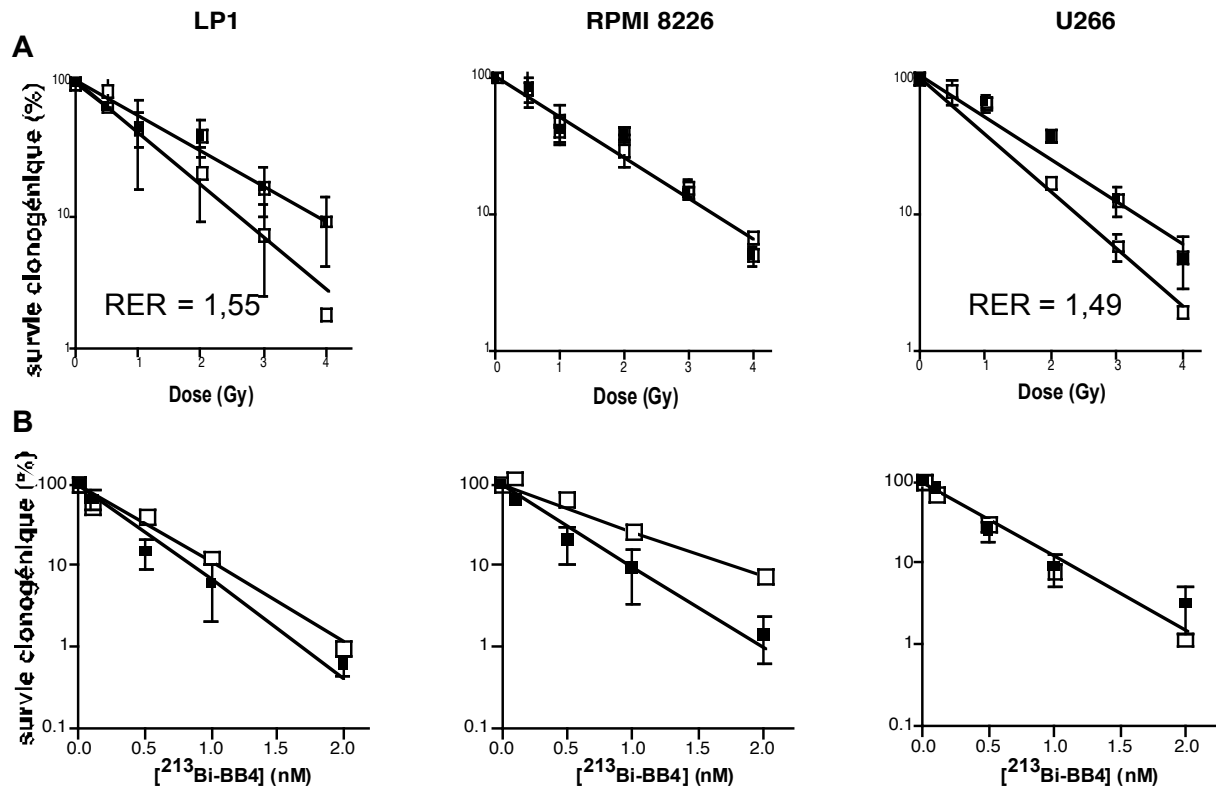


Figure 33 : survie clonogénique après irradiation gamma (A) ou alpha (B), seule (carrés pleins) ou irradiation combinée à 10 nM de gemcitabine (carrés vides)

#### **4.2.4.3 importance de l'apoptose dans la combinaison des rayonnements ionisants avec la gemcitabine**

Parmi les mécanismes susceptibles d'expliquer l'effet synergique des rayonnements ionisants et de la gemcitabine, une majoration de l'apoptose radio-induite a été suggérée pour certaines lignées cellulaires<sup>151</sup>. Nous avons retenu des doses provoquant une survie clonogénique comparable de l'ordre de 3 à 5 % pour les 2 types de rayonnements, soit 4 Gy en irradiation gamma et 2 nM de <sup>213</sup>Bi- B-B4 marqué à une activité spécifique de 4 mCi/mg pour l'irradiation alpha. La gemcitabine à la dose de 10 nM a entraîné une apoptose significative pour les 3 lignées (Figure 34). À mortalité cellulaire équivalente, l'irradiation alpha a entraîné une apoptose plus importante que l'irradiation gamma pour la lignée RPMI 8226 (29% vs 15%), mais pas pour les autres lignées. Les cellules LP1 exposées à la gemcitabine puis à une irradiation gamma ont montré un plus fort taux d'apoptose (14,5%) que celles exposées à la gemcitabine seule (9,3%, p=0,011) ou à une irradiation gamma seule (8,9%, p=0,031). Les cellules U266 exposées à la gemcitabine puis à une irradiation gamma présentent un plus fort taux d'apoptose (12,2%) que celles exposées à la gemcitabine seule (8,9%, p=0,018) ou à une irradiation gamma seule (7,1%, p=0,032). La proportion de cellules apoptotiques n'a pas évolué pour les RPMI 8226 exposées à un traitement combiné par gemcitabine et irradiation gamma. Pour ce qui concerne l'irradiation à haut TEL, l'apoptose après traitement par gemcitabine et RIT alpha n'était pas plus élevée que l'apoptose après RIT alpha ou gemcitabine seule pour les 3 lignées de myélome multiple.

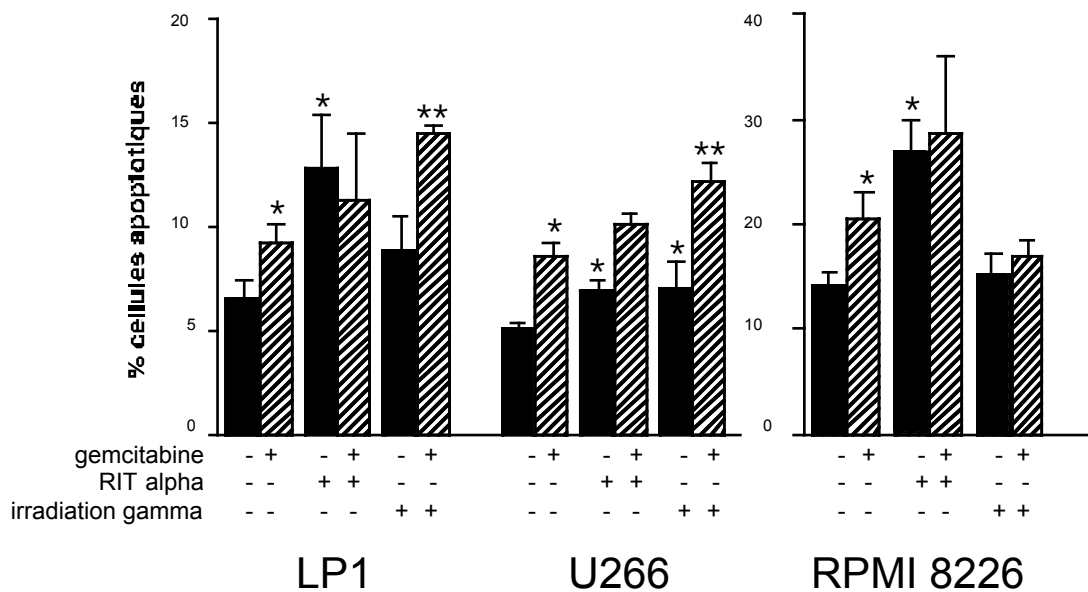


Figure 34 : apoptose après traitement par gemcitabine, irradiation alpha, irradiation gamma ou leur combinaison (marquage en cytométrie de flux à l'aide de l'anticorps apo 2.7)

\* différence significative avec le témoin ; \*\* différence significative du traitement combiné avec les traitements non combinés.

#### 4.2.5 Bilan

Les cellules irradiées par RIT alpha ont été radiosensibilisées à l'aide de paclitaxel ou de doxorubicine, par des mécanismes proches de ceux mis en œuvre dans les combinaisons avec une irradiation gamma. Par contre, la gemcitabine n'a pas présenté d'effet supra-additif avec la RIT alpha alors que cet effet a pu être mesuré sur les mêmes lignées avec une irradiation gamma en raison de mécanismes impliquant l'apoptose radioinduite.

### **4.3 Résultats préliminaires concernant l'étude de la transduction du signal après irradiation**

La radiosensibilité variable des lignées de myélome à l'irradiation alpha soulève la question de l'origine de ces variations. En plus du rôle connu des effets des rayonnements ionisants sur l'ADN, des phénomènes membranaires conduisant à la mort cellulaire après transduction du signal semble impliqués dans la réponse à une irradiation gamma. Peu de données concernent une irradiation alpha. Nous avons mesuré l'expression protéique de différentes protéines impliquées dans les voies de transduction du signal : RAF-1 (ser 259), ERK 1/2 (thr 202/tyr 204), p38 (thr180/tyr 182) et AKT (ser 473) pour analyser leur implication dans la réponse aux rayonnements alpha en comparaison avec une irradiation gamma.

Nous avons retenu 2 lignées, LP1 et U266, de radiosensibilité très différente à une irradiation alpha et de radiosensibilité comparables à une irradiation gamma. Pour mesurer l'activité de ces protéines, nous avons étudié leur phosphorylation durant la première heure après irradiation. Nous avons sélectionné une première dose d'irradiation faible responsable d'une survie cellulaire comparable de l'ordre de 5 % (survie de 6 % des cellules après irradiation gamma à 4 Gy pour LP1 et U266 ; survie de 2% et 6,6% pour LP1 et U266 respectivement après irradiation alpha à l'aide de 2 nM de l'anticorps B-B4 marqué au bismuth 213 à une activité spécifique de 150 MBq/mg, soit 0,7 et 1,3 Gy respectivement). Nous avons retenu une deuxième dose d'irradiation plus forte, de 12 Gy en irradiation gamma (survie de 0,02% des cellules LP1 ou U266) et de 2 nM de l'anticorps B-B4 marqué au bismuth 213 à une activité spécifique de 750 MBq/mg (soit une dose de 4 et 5,2 Gy associée à une survie de moins de 0,001% et 0,002% pour les cellules LP1 et U266 respectivement).

### **4.3.1 Réponse à une irradiation gamma**

#### **4.3.1.1 Irradiation gamma de la lignée LP1**

L'irradiation gamma de la lignée LP1 a entraîné une élévation précoce de l'expression protéique des différentes voies de transduction étudiées, à un niveau dépendant de la dose d'irradiation (Figure 35 A et B).

Les taux des protéines ERK1/2 phosphorylées ont augmenté après irradiation, avec un maximum de 2,2 fois le taux initial à 4 Gy et de 1,8 fois à 12 Gy. De manière comparable, l'expression de la protéine p38 phosphorylée a présenté une hausse à 30 minutes à un niveau 3 fois plus élevé que son taux basal, pour revenir aux valeurs initiales 1 heure après irradiation, après irradiation gamma à la dose de 4 Gy. Après une dose de 12 Gy, les mêmes variations sont observées dans des amplitudes plus marquées. Les taux des protéines AKT phosphorylée et RAF-1 ont connu une hausse de 2 et 2,5 fois leur taux initial respectivement dans les temps précoces (entre 15 et 30 min) pour les deux niveaux de dose.

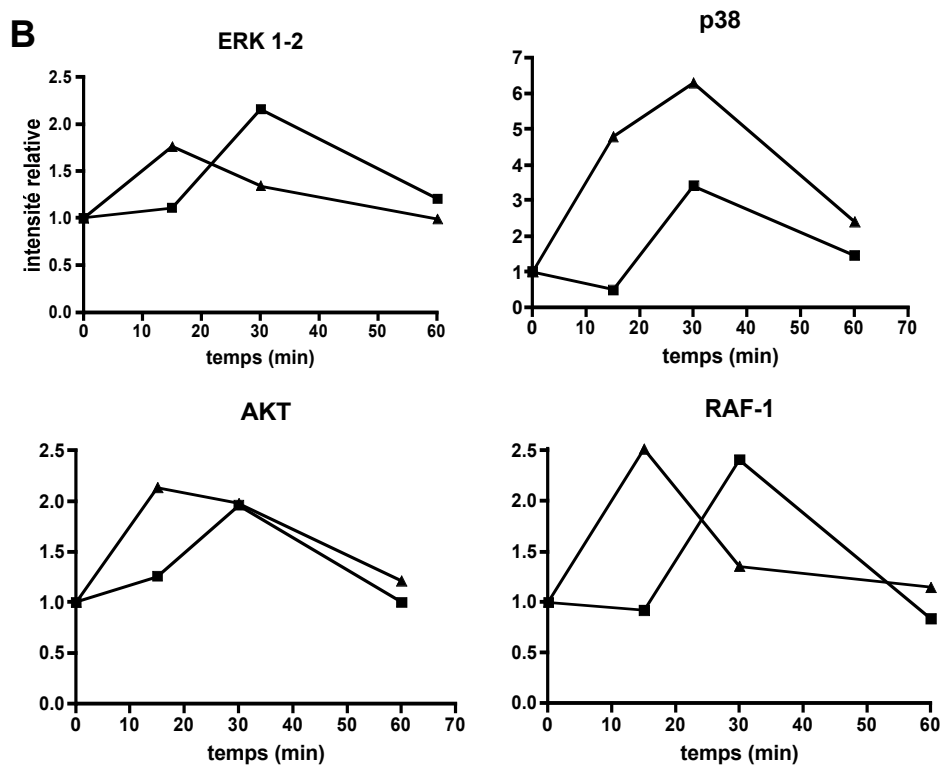
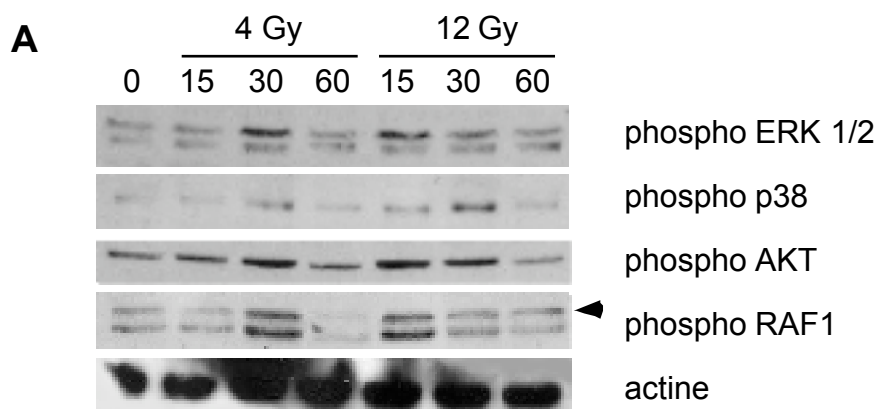


Figure 35 : Lignée LPI - A - Étude par Western-Blot de la phosphorylation des protéines ERK 1/2, p38, AKT et RAF-1 après irradiation gamma à 4 Gy (carré) ou 12 Gy (triangle). - B - Courbes obtenues après quantification à l'aide du logiciel ImageJ rapportée à l'actine.

#### **4.3.1.2 Irradiation gamma de la lignée U266.**

L'irradiation gamma de la lignée U266 a provoqué une phosphorylation précoce de toutes les protéines étudiées, mais à un niveau plus faible que LP1 (Figure 36 A et B).

L'expression des protéines RAF-1 et ERK 1/2 a atteint deux fois le taux basal une heure après irradiation. Après irradiation à forte dose, RAF-1 demeure toutefois inchangée. Le taux de protéine p38 phosphorylée s'est élevé à un niveau de l'ordre de 1,7 fois le niveau de base après irradiation gamma à la dose de 4 Gy. Après une irradiation à 12 Gy, le taux de phosphorylation chute progressivement pour atteindre 20 % de son taux basal à 1 heure. L'expression de la protéine AKT phosphorylée s'est faiblement élevé après irradiation gamma, que ce soit après 4 ou 12 Gy.



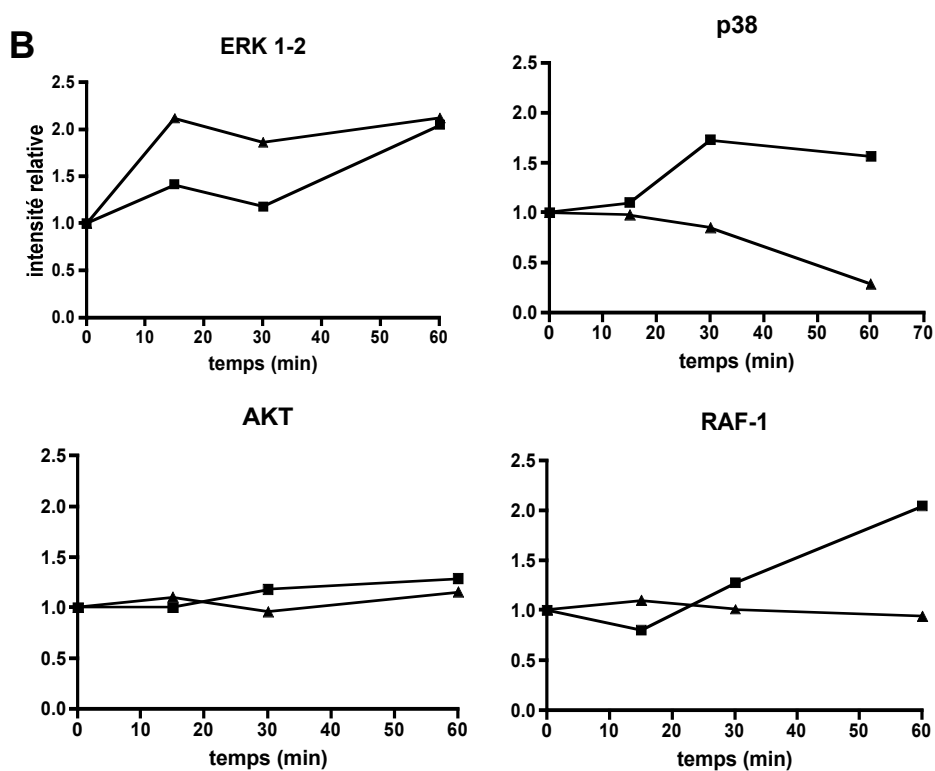
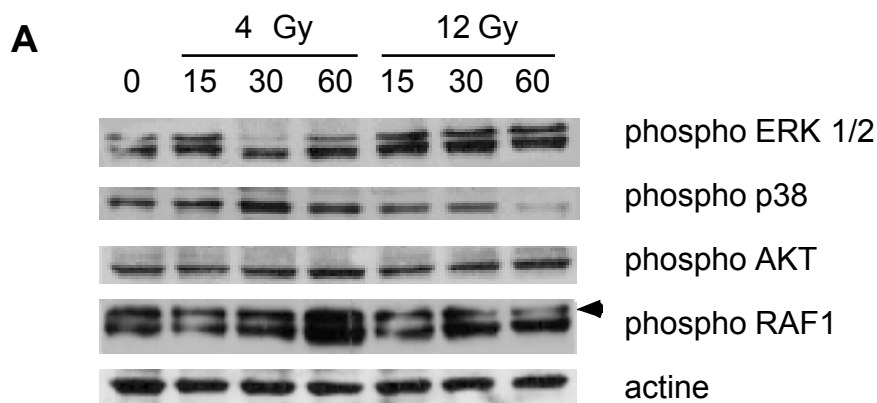


Figure 36 : Lignée U266 - A- Étude par Western-Blot de la phosphorylation des protéines ERK 1/2, p38, AKT et RAF-1 après irradiation gamma à 4 Gy (carré) ou 12 Gy (triangle). - B - Courbes obtenues après quantification à l'aide du logiciel ImageJ rapportée à l'actine.

## **4.3.2 Voies de signalisation induites par une irradiation alpha**

### **4.3.2.1 Irradiation alpha de la lignée LP1**

L'irradiation alpha a entraîné une activation de multiples voies de transduction du signal (Figure 37 A et B).

L'expression des protéines RAF-1 et ERK 1/2 et p38 phosphorylées a été induite par l'irradiation alpha. Les maxima de phosphorylation pour les protéines RAF-1 et ERK 1/2 ont été obtenus à 30 minutes que ce soit après une irradiation alpha à 150 MBq/mg ou 750 MBq/mg. La dose la plus élevée a abouti à une plus forte phosphorylation d'environ 1,7 et 1,4 fois le taux de base, pour RAF-1 et ERK 1/2 respectivement. Pour la protéine p38, cette phosphorylation a été plus dépendante de l'activité ajoutée puisque le maximum a été obtenu après 15 minutes d'incubation (environ 1,6 fois le taux initial) alors qu'à 150 MBq/mg le maximum correspondant à 1,4 fois le taux de base n'a été obtenu qu'après 60 minutes.

A l'inverse des trois protéines précédentes, l'irradiation alpha n'a pas entraîné de phosphorylation de la protéine AKT (baisse de phosphorylation de 40 % pour une dose de 150 MBq/mg, à 15 minutes et de 20 % pour une dose de 750 MBq/mg, à 30 minutes).

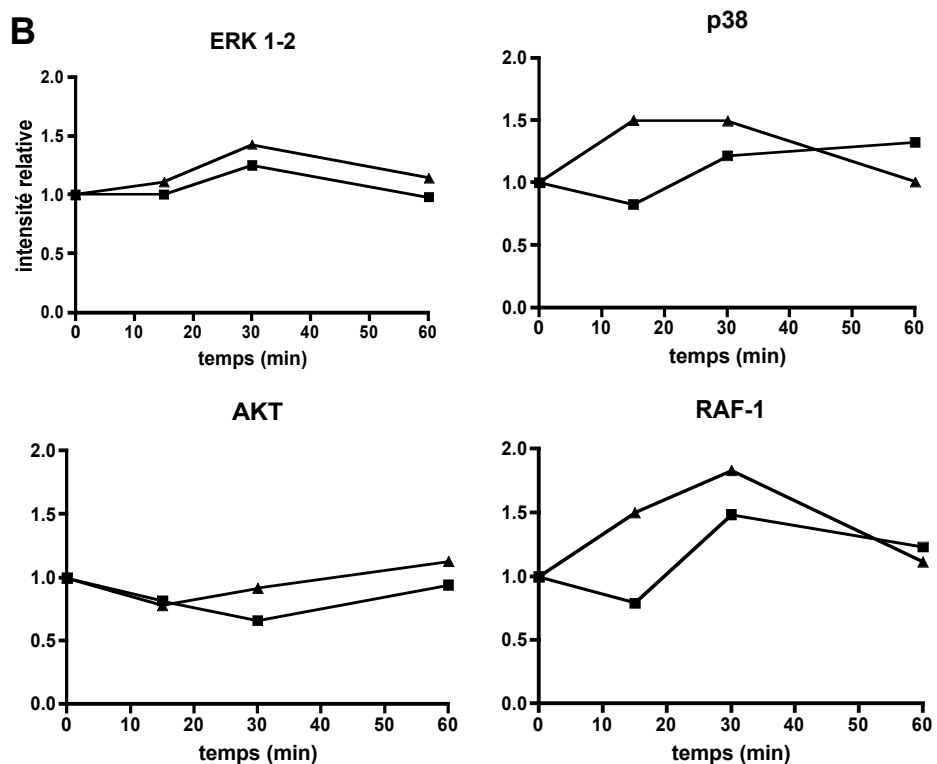
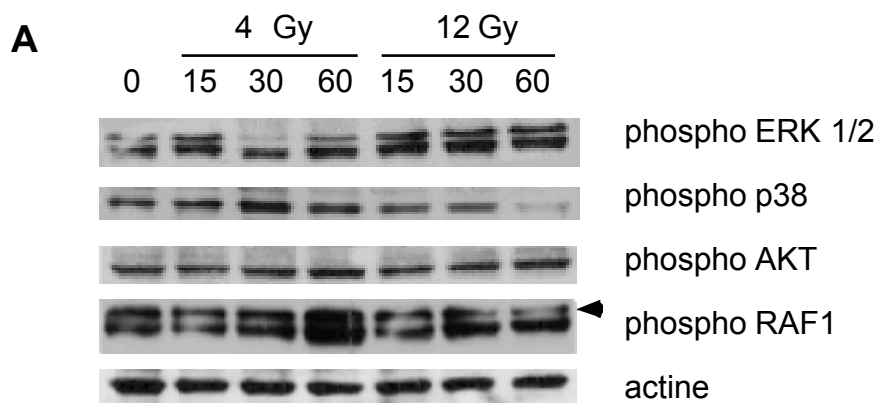


Figure 37 : Lignée LP1 - A - Étude par Western-Blot de la phosphorylation des protéines ERK 1/2, p38, AKT et RAF-1 après irradiation alpha ( $^{213}\text{Bi-B-B4}$  à 2 nM) à la dose de 0,7Gy (carré) ou 4 Gy (triangle). - B - Courbes obtenues après quantification à l'aide du logiciel ImageJ rapportée à l'actine.

#### **4.3.2.2 Irradiation alpha de la lignée U266**

A la différence de la lignée LP1, l'irradiation alpha de la lignée U266 a entraîné une activation des protéines AKT et RAF-1, sans modification de p38, et avec une inhibition de ERK 1/2.

La phosphorylation des protéines ERK 1/2 a été inhibée par l'irradiation alpha. Le taux de phosphorylation chute progressivement pour atteindre 20 % de leur taux basal à 1 heure après irradiation à faible dose ou 60 % du taux basal après irradiation à forte dose.

La protéine p38 n'a montré aucune variation de phosphorylation pendant la première heure après irradiation alpha, que ce soit à faible ou forte activité.

La phosphorylation de la protéine AKT a été induite par l'irradiation alpha. Après irradiation à faible dose, cette phosphorylation a crû dès 15 minutes (environ 1,4 fois le taux initial) puis a présenté un plateau à 1,6 fois le taux de base entre 30 et 60 minutes. Après 15 minutes d'une irradiation à forte dose, cette phosphorylation a atteint un taux maximal de 2,5 fois le taux initial.

La phosphorylation de la protéine RAF-1 a été largement augmentée (taux multiplié par 2,7) à 15 minutes puis a décru progressivement pour retourner à son taux basal une heure après irradiation à faible activité. Après irradiation à forte activité, un taux maximal 2,4 fois supérieur au taux basal a été obtenu à 30 minutes.

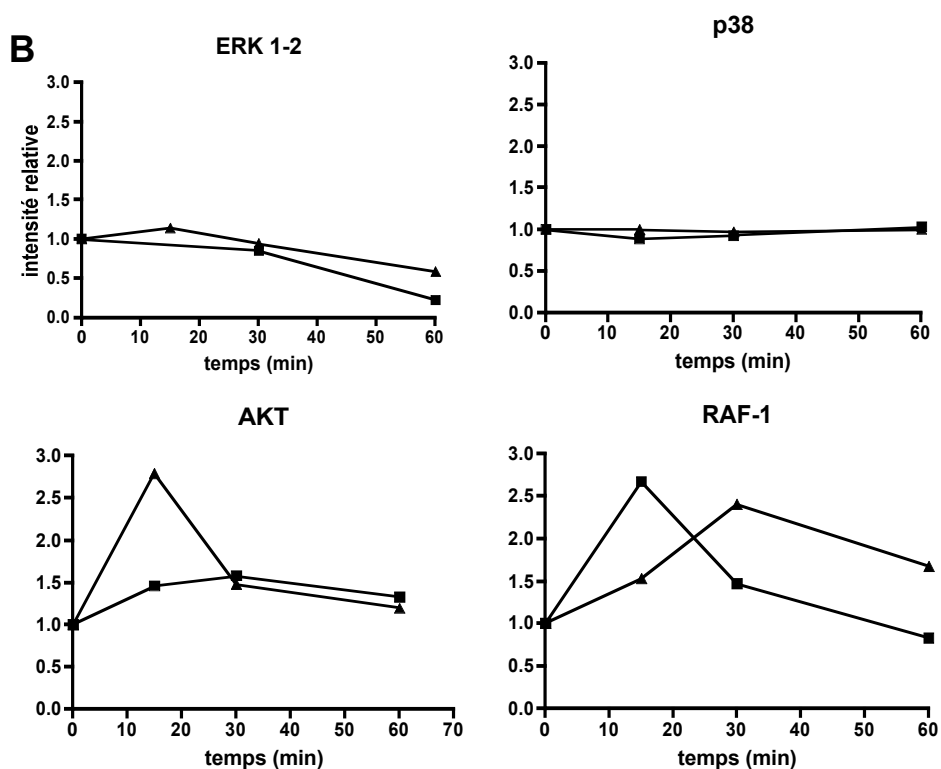
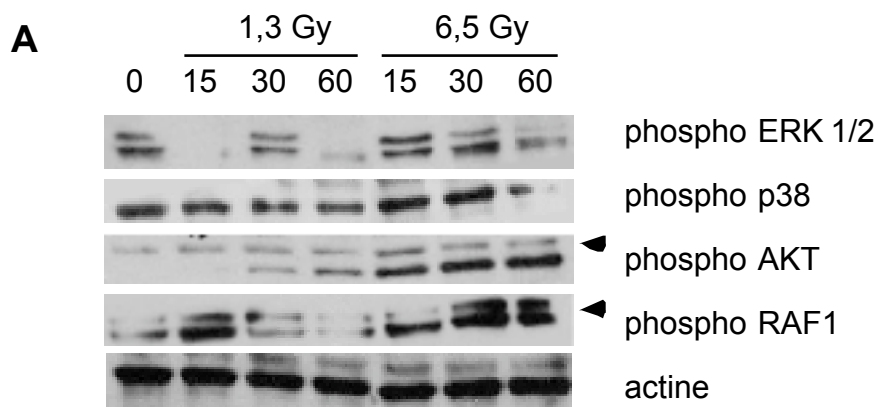


Figure 38 : Lignée U266 - A - Étude par Western-Blot de la phosphorylation des protéines ERK 1/2, p38, AKT et RAF-1 après irradiation alpha ( $^{213}\text{Bi-B-B4}$  à 2 nM) à la dose de 1,3 Gy (carré) ou 5,2 Gy (triangle). - B - Courbes obtenues après quantification à l'aide du logiciel ImageJ rapportée à l'actine.

### 4.3.3 Influence de K-RAS 4B sur la prolifération cellulaire de la lignée U266 après irradiation

L'implication de RAS dans la résistance aux rayonnements ionisants de faible TEL est largement documentée (pour revue<sup>59,87</sup>). Nous avons décidé d'étudier l'implication de cette oncoprotéine dans la résistance à une irradiation à haut TEL. Une stratégie de transfection stable de l'isoforme K-Ras 4B sauvage dans la lignée U266. La stabilité de la transfection a été contrôlée par RT-PCR (Figure 39), et par visualisation en microscopie à fluorescence de la protéine de fusion GFP-K-Ras 4B. Les tentatives de transfection des formes mutées de K-Ras 4B muté ou K-Ras 4A ont été initialement efficaces, mais en cours de sélection antibiotique l'expression de la protéine disparaît. Nous avons alors décidé de ne pas étudier les effets de cette transfection seulement transitoire avec les difficultés de reproductibilité de ces expérimentations, alors que la difficile disponibilité d'un générateur de particules alpha implique de travailler avec du matériel préparé de nombreuses semaines plus tôt.

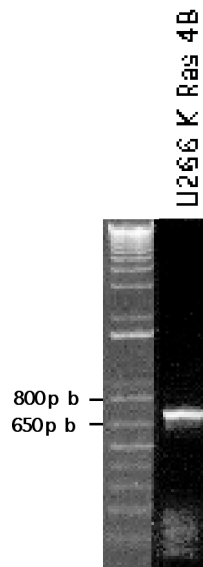


Figure 39 : Produit d'amplification obtenus après RT-PCR sur les cellules U266 transfectées avec le plasmide pEGFP-C3-K-Ras 4B. Le fragment amplifié correspond au fragment inséré dans le vecteur d'expression pEGFP-C3.

Après irradiation gamma, une réduction moins importante de la prolifération est observé pour les cellules transfectées U266-K-RAS4B en comparaison avec la lignée U266 sauvage (Figure 40A). De la même manière qu'après irradiation gamma, une réduction moins importante de la prolifération est observé pour les cellules transfectées U266-K-RAS4B en comparaison avec la lignée U266 sauvage après irradiation alpha (Figure 40B).

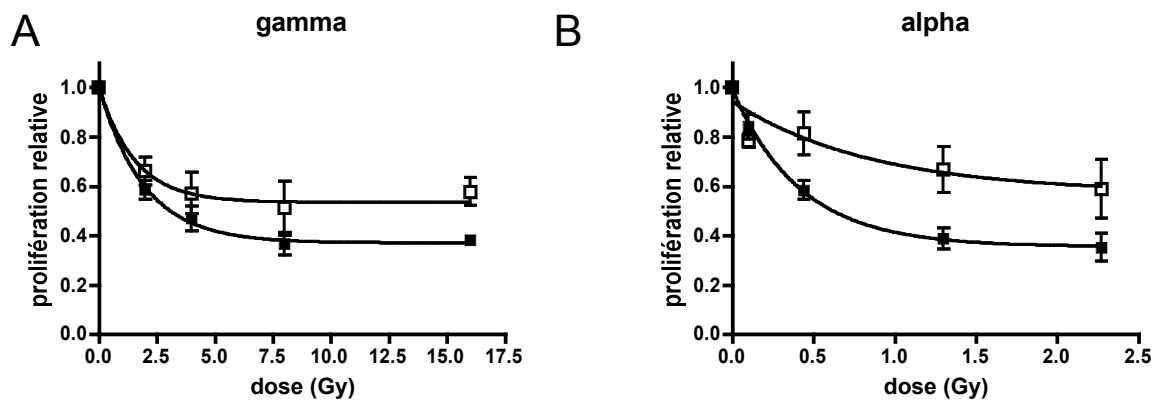


Figure 40 : Prolifération cellulaire (test d'incorporation de thymidine tritiée) 24 heures après irradiation gamma (A) ou RIT alpha (B) des cellules U266 (carrés pleins) et U266-K-Ras 4B (carrés vides).

## 5 Discussion

Trois principales étapes ont conduit la réflexion de ce travail de thèse.

La première étape s'est attachée à caractériser la réponse cellulaire à l'irradiation en comparant les effets d'une irradiation alpha, bêta et gamma sur la mortalité cellulaire selon ses différentes modalités, après sélection du meilleur vecteur de radioimmunothérapie. Cette étape a permis de déterminer que l'anticorps B-B4 était le mieux adapté comme vecteur, et que la RIT alpha était plus efficace que la RIT bêta pour irradier ces cellules de myélome isolées ou en amas de quelques cellules. Cette étape a permis de vérifier que l'efficacité biologique relative de la RIT alpha et de montrer des variations importantes de radiosensibilité des lignées de myélome.

Face à la radiorésistance de certaines lignées de myélome multiple, la deuxième étape de ce travail de thèse a recherché une possible radiosensibilisation de la RIT alpha à l'aide de chimiothérapies anti-mitotiques et d'en étudier les mécanismes. Cette deuxième étape a permis de vérifier l'hypothèse qu'il était possible d'amplifier de façon synergique les effets anti-tumoraux de la RIT alpha par des chimiothérapies. Les mécanismes imputables à cette radiosensibilisation impliquaient une synchronisation dans la phase G2-M du cycle cellulaire et une majoration des lésions radioinduites de l'ADN. De plus, l'absence de radiosensibilisation de la RIT alpha par la gemcitabine a pu être mise sur le compte d'une absence d'induction supplémentaire d'apoptose.

Cette radiorésistance relative à la RIT alpha a enfin conduit à tenter de mieux comprendre les effets intracellulaires de l'irradiation, en s'intéressant aux mécanismes de transduction du signal. Nos résultats préliminaires ont montré que la protéine K-RAS majorait la résistance à l'irradiation alpha. Enfin, l'irradiation alpha a déclenché une activation de la voie AKT pour la lignée la plus radiorésistante, ce qui ouvre la voie à des études d'association d'inhibiteurs de la voie AKT avec l'irradiation alpha.



## 5.1 Comparaison des anticorps B-B4 et MA5

Nos différents résultats ont montré une supériorité de l'anticorps B-B4 sur l'anticorps MA5. Tout d'abord, l'anticorps B-B4 a reconnu 100% des cellules myélomateuses de patients, alors que MA5 n'en a reconnu qu'un peu plus de la moitié. B-B4 a montré une meilleure affinité que l'anticorps MA5 sur ces lignées de myélome multiple, ce qui explique probablement que la prolifération cellulaire était plus réduite pour l'anticorps B-B4 marqué au bismuth 213 que pour l'anticorps MA5 radiomarqué. De plus, une large part de l'effet de l'anticorps MA5 était apparemment en lien avec une irradiation non spécifique, au moins pour ce qui concerne les plus hautes activités ajoutées. Enfin, les cellules irradiées par le B-B4 marqué au bismuth 213 présentaient un blocage plus important dans la phase G2-M du cycle cellulaire qu'après irradiation au MA5 radiomarqué.

Ainsi, MA5 était moins intéressant pour cibler les cellules de myélomes multiples. Ce défaut de ciblage serait peut-être à mettre sur le compte d'une fixation de l'anticorps sur le MUC-1 soluble<sup>137</sup>, ce qui fausserait les résultats de mesure de l'affinité et de mortalité cellulaire.

Le MA5 pourrait tout de même représenter une alternative au B-B4 comme vecteur de radioimmunothérapie dans le cas où une toxicité indésirable du B-B4 radiomarqué survenait en lien avec la fixation immunohistochimique du B-B4 sur le parenchyme pulmonaire, l'épithélium intestinal, le rein et le cœur que nous avons retrouvée. Étant donné que B-B4 n'est pas internalisé, la fixation cytosolique du B-B4 observée dans le rein et le cœur ne serait probablement pas cliniquement significative. À l'inverse, l'utilisation du MA5 reconnaissant principalement le foie et le duodénum en combinaison avec le B-B4 permettrait de limiter une toxicité éventuelle du B-B4 radiomarqué. De plus, l'expression de MUC1 étant induite par la dexaméthasone, cela suggérerait une plus grande efficacité de MA5 comme vecteur de radioimmunothérapie en association avec les corticoïdes<sup>136</sup>. Une combinaison de MA5 et B-B4 pourrait être intéressante afin de cibler le myélome multiple, tout en diminuant la fixation sur les organes sains.

## 5.2 Comparaison RIT alpha et RIT bêta

Le bismuth 213, émetteur alpha, était mieux adapté que l'iode 131 émetteur bêta, pour le ciblage thérapeutique de ce modèle tumoral à cellules isolées que représente le myélome multiple. Le B-B4 marqué au bismuth 213 était nettement plus cytotoxique que le même anticorps marqué à l'iode 131 que ce soit en termes de métabolisme (MTT test), blocage dans le cycle cellulaire, ou survie clonogénique. L'efficacité modeste de l'iode 131 fixée sur l'anticorps ne peut résulter d'une déiodination de l'anticorps dans son passage transmembranaire, puisque l'anticorps n'est pas internalisé. 95% de la désintégration de l'iode 131 fixé sur son vecteur survient dans un rayon de  $1000 \mu\text{m}^{152}$ . Si les cellules de myélome sont placées à une distance de  $100 \mu\text{m}$  et à une concentration de 50 000 cellules par millilitre, cette énergie est délivrée à distance de la cible. Ainsi, la RIT bêta est mieux adaptée aux tumeurs de  $10^5$  à  $10^7$  cellules<sup>153</sup>. Le parcours maximal des particules alpha émises par la désintégration du bismuth 213 est de  $80 \mu\text{m}$ ; l'énergie est alors délivrée près du noyau cellulaire. La comparaison en termes de transfert linéique d'énergie (TEL) est nettement en faveur des émetteurs alpha puisque le TEL des particules alpha est de l'ordre de  $100 \text{ keV}/\mu\text{m}$ , alors que le TEL de l'yttrium 90, le plus énergétique des émetteurs bêta n'est que de  $0,2 \text{ keV}/\mu\text{m}^{154}$ . Nos résultats sont comparables avec ceux obtenus *in vitro*<sup>42,155</sup>, ou les résultats obtenus chez l'animal<sup>44,45</sup>, et confirme l'intérêt clinique potentiel majeur de la RIT alpha pour les tumeurs hématologiques<sup>26</sup>.

### 5.3 Efficacité biologique relative de la RIT alpha et notion de radiorésistance à l'irradiation alpha

L'efficacité biologique après RIT alpha du myélome multiple a été comparable aux données de la littérature, mais cet EBR varie en fonction du phénomène observé et surtout a été dépendant de la lignée cellulaire.

Les calculs de dose ont permis de corriger les données initiales de survie clonogénique en fonction de l'activité ajoutée pour aboutir à des courbes de survie en fonction de la dose délivrée. Les dimensions cellulaires jouent un rôle majeur dans la définition de la dose. Ainsi, les 3 lignées LP1, RPMI 8226 et U266 ont présenté une mortalité équivalente à activité ajoutée identique. Par contre, à dose identique, la lignée LP1 est nettement plus radiosensible que les lignées RPMI 8226 et U266. Ce calcul dosimétrique est basé sur la probabilité qu'une particule alpha atteigne le noyau cellulaire et tient donc tout particulièrement compte de la dimension du noyau et de sa position dans la cellule. Si des phénomènes membranaires interviennent également dans la mortalité induite par une irradiation alpha, les calculs de dose ne tiennent pas compte de cette composante, ce qui pourrait modifier ces résultats.

Nos résultats ont montré que l'EBR dépendait non seulement du phénomène mesuré, mais aussi de la lignée cellulaire. Pour la lignée LP1, l'efficacité biologique relative était comparable pour les études de survie clonogénique et pour la prolifération cellulaire. Par contre, pour la lignée U266, l'EBR calculé à partir de la survie clonogénique était nettement plus faible qu'à partir de la prolifération. Des études *in vitro* ont retrouvé des EBR comprises entre 10 et 20 pour les particules alpha<sup>41,47</sup>. *In vivo*, les EBR dépendent de l'énergie de la particule alpha et de son TEL<sup>156,157</sup>. Après irradiation au bismuth 213 de lymphocytes de leucémie lymphoïde chronique, une EBR comprise entre 2 et 2,2 était retrouvée<sup>148</sup>. Pour l'induction d'effets nucléaires après irradiation alpha, l'EBR variait entre 3,5 et 4 pour la mortalité, entre 6 et 12 pour les mutations et 10 pour les transformations cellulaires<sup>158</sup>.

Nos résultats ont montré que l'induction d'apoptose ne dépendait pas seulement du type cellulaire considéré, mais aussi de la lignée cellulaire à l'intérieur d'un même type cellulaire. Dans notre modèle de myélome multiple, l'irradiation alpha a provoqué une apoptose plus importante que l'irradiation gamma pour LP1 et RPMI 8226, tandis que pour la lignée U266,

quasiment aucune apoptose n'était provoquée par l'irradiation qu'elle soit alpha ou gamma. La radiorésistance n'était pas corrélée à cette absence d'apoptose puisque la lignée RPMI 8226 est sensible à l'apoptose, mais aussi résistante qu'U266 du point de vue de la mortalité. La part relative de l'apoptose immédiate et de la mort clonogénique à la suite d'une irradiation dépend du type cellulaire, et la survenue de l'apoptose caractérise généralement les cellules lymphoïdes<sup>159</sup>, comme ces lignées de myélome. Nos résultats obtenus par marquage à l'anticorps apo 2.7 confirment nos données précédentes obtenues après marquage à l'acridine orange<sup>141</sup>. L'EBR de l'irradiation alpha au regard de l'apoptose est donc très variable entre les lignées cellulaires, même si un chiffre précis n'est pas calculable ici en raison du type de courbe d'apoptose observée. L'apoptose apparaît plus rapidement en cas d'irradiation à haut TEL que lors d'une irradiation à bas TEL<sup>160</sup>. Vandembulcke *et coll.* retrouvaient un même niveau maximal d'apoptose, mais les doses qui permettaient d'obtenir ce plateau étaient plus faibles pour la RIT alpha que pour l'irradiation externe<sup>148</sup>, ce qui permettait de conclure à une supériorité d'induction d'apoptose de la RIT alpha comparée à l'irradiation externe. Ici, le plateau maximal est significativement différent entre les deux types d'irradiation. La RIT alpha de cellules adénocarcinomeuses gastriques n'a pas provoqué d'apoptose<sup>161</sup>, mais de nombreuses autres lignées notamment lymphoïdes ont répondu à l'irradiation alpha par une apoptose<sup>148,162,163</sup>

## 5.4 Effets synergiques de la RIT alpha avec le paclitaxel et la doxorubicine

La combinaison de la RIT alpha avec des chimiothérapies anti-mitotiques pourrait être synergique à condition que la substance active agisse à travers un mécanisme qui augmente la réponse cellulaire à l'anticorps radiomarqué. Nous avons noté que la RIT alpha induisait des phénomènes cellulaires actifs comme une redistribution des cellules dans le cycle cellulaire ou bien une apoptose. La sensibilité variable des lignées au type de chimiothérapie et à la RIT alpha n'a pas représenté un obstacle à la combinaison de chimiothérapies et de RIT alpha, puisque l'effet synergique entre la RIT alpha et le paclitaxel ou la doxorubicine a été noté quelle que soit la sensibilité initiale de la lignée à la chimiothérapie. De plus, la combinaison avec une chimiothérapie pourrait permettre de détruire plus aisément les lignées les moins radiosensibles.

Parmi les 4 chimiothérapies que nous avons testées, l'association avec la RIT alpha et le paclitaxel et la doxorubicine était synergique, l'association avec la dexaméthasone était additive et l'association avec la vinblastine était antagoniste. Pour le paclitaxel, les RER que nous avons obtenus étaient comparables avec ceux obtenus en combinaison avec les rayons X ou gamma sur des lignées cellulaires (pour revue<sup>164</sup>) ou avec la RIT bêta dans des modèles murins<sup>165-167</sup>. La réponse à la combinaison RIT alpha et doxorubicine était synergique pour les 3 lignées mais seulement additive après une incubation de 24 heures. Ce type de combinaison synergique a été rapporté pour des lignées de lymphomes B<sup>168</sup> et *in vivo* dans des modèles de carcinome médullaire de la thyroïde<sup>169</sup>.

Nos résultats indiquent que le paclitaxel et la doxorubicine pourraient être combinés avec la RIT alpha lors d'essais cliniques ultérieurs chez des patients porteurs de myélome multiple. Le paclitaxel a permis l'obtention de quelques réponses que ce soit seul<sup>170</sup> ou en association pour intensification thérapeutique<sup>171</sup>. Malheureusement, son administration a donné lieu à des toxicités non-hématologiques sévères pour 4 patients sur 14 dans une étude de l'ECOG<sup>172</sup>. Dans notre travail, le paclitaxel a permis une potentialisation de la RIT alpha à des concentrations faibles (1 nM) compatibles avec les concentrations plasmatiques mesurées

*in vivo*<sup>173</sup>. La doxorubicine est déjà utilisée activement comme traitement conventionnel ou en intensification et pourrait être associée à la RIT alpha lors d'études cliniques ultérieures. La dexaméthasone ne présente que peu d'effets secondaires cliniques et son association avec la RIT alpha ne majorerait pas la toxicité potentiellement hématologique de la RIT alpha. À l'inverse, l'association de la vinblastine et la RIT alpha paraît contre-indiquée. Des études cliniques détermineront si une combinaison chimiothérapie et RIT alpha pourrait représenter une alternative aux régimes actuels de conditionnement avant autogreffe de moelle osseuse dans le cadre du traitement du myélome multiple.

## 5.5 Mécanismes de l'effet synergique de la RIT alpha avec la doxorubicine ou le paclitaxel

Une meilleure compréhension des mécanismes de la radiosensibilisation de la RIT alpha pourrait permettre de mieux sélectionner les molécules susceptibles d'être associées à la RIT alpha, et d'optimiser les schémas d'administration des traitements combinés.

Nos résultats ont montré que la synchronisation des cellules dans la phase G2-M du cycle cellulaire pourrait partiellement expliquer l'effet synergique observé entre la RIT alpha et le paclitaxel et la doxorubicine. De plus une majoration des lésions radioinduites de l'ADN pourrait participer aux mécanismes de la radiosensibilisation de la RIT alpha par la doxorubicine, pour certaines lignées cellulaires. Enfin, l'apoptose n'est pas intervenue dans les mécanismes de la radiosensibilisation de la RIT alpha par le paclitaxel ou la doxorubicine.

Une synchronisation dans la phase G2-M du cycle cellulaire participe à l'explication de l'effet synergique entre la RIT alpha et le paclitaxel ou la doxorubicine. Nos résultats ont montré un lien entre la cinétique d'apparition d'un blocage dans la phase G2-M et un effet supra-additif. La séquence d'administration a revêtu une grande importance pour l'apparition de cet effet. En effet, la doxorubicine n'a permis un effet radiosensibilisant qu'en cas d'incubation de 24 heures et non après incubation de 2 heures. À l'inverse, l'effet radiosensibilisant du paclitaxel était observé que ce soit après 2 ou 24 heures d'incubation. Les analyses du cycle cellulaire ont montré qu'aucun blocage dans la phase G2-M du cycle cellulaire ne survenait pour la doxorubicine avant 24 heures. Contrairement à la doxorubicine, le paclitaxel a induit une synchronisation précoce des cellules dans cette même phase du cycle cellulaire.

Les cellules en phase G2-M sont plus sensibles aux rayonnements ionisants que les cellules irradiées en phase G1 ou S<sup>89</sup>. Les taxanes induisent un blocage majeur dans la phase G2-M du cycle cellulaire, et ce phénomène est considéré comme étant une explication majeure de leur effet radiosensibilisant avec les rayons X ou gamma<sup>92,174,175</sup>. Nos résultats suggèrent que cette synchronisation intervient aussi dans la radiosensibilisation des effets de

la RIT alpha. Ce mécanisme a concerné aussi la doxorubicine qui induit une synchronisation en G2-M de cinétique plus lente que le paclitaxel. Cependant ces analyses sont tempérées par les résultats concernant la lignée U266 qui n'a pas présenté de blocage aussi intense et rapide que les 2 autres lignées alors que l'effet radiosensibilisant était de même amplitude. De plus le pourcentage de cellules bloquées dans la phase G2-M à 24 heures était proche pour les lignées LP1 ou RPMI 8226 après traitement par paclitaxel ou doxorubicine alors que le RER du paclitaxel était nettement plus élevé que celui de la doxorubicine. Liebmann notait que des lignées ne présentant pas de blocage dans la phase G2-M étaient tout de même radiosensibilisées par le paclitaxel<sup>92</sup>. Ainsi, la synchronisation dans une phase plus sensible à l'action des rayonnements ionisants ne peut représenter la seule explication de l'effet radiosensibilisant de ces deux médicaments. De faibles doses de paclitaxel (nM) peuvent stabiliser les microtubules ce qui induit un arrêt des cellules avant la phase de mitose<sup>94</sup>. Existe-t'il un lien entre l'interaction avec les microtubules et une plus grande sensibilité à la RIT alpha ? Pourtant, la vinblastine interagit aussi avec les microtubules (pour revue<sup>176</sup>), mais n'induit pas de radiosensibilisation avec la RIT alpha à des doses qui toutefois n'induisent pas d'arrêt en G2-M aux doses que nous avons étudiées. De façon intéressante, Porter a montré qu'une irradiation gamma stimulait la production et la polymérisation de la tubuline, ce qui conduit à des changements visibles dans la structure des microtubules<sup>177</sup>. Nous pouvons alors soulever l'hypothèse que les particules alpha interagissent aussi avec les microtubules, et que la modulation des réseaux de tubulines pourrait fortement amplifier les effets des particules alpha. De nombreuses expérimentations restent nécessaires pour explorer les liens entre radiosensibilisation et la phase G2-M du cycle cellulaire.

D'autres mécanismes ont été évoqués afin d'expliquer les mécanismes de la radiosensibilisation par certaines chimiothérapies, comme l'accroissement des lésions de l'ADN radioinduites ou l'inhibition de leur réparation<sup>178</sup>. Pour la lignée RPMI 8226, nos résultats ont retrouvé un plus grand nombre de cassures simple et double brins de l'ADN après traitement combiné par doxorubicine et RIT alpha en comparaison avec la doxorubicine ou la RIT alpha seule. Ces résultats étendent à la combinaison doxorubicine-particules alpha les résultats de Byfield concernant les effets combinés de la doxorubicine et des rayonnements photoniques<sup>149</sup>. Bonner avait noté que les effets radiosensibilisants de la doxorubicine étaient corrélés avec le taux résiduel de cassures doubles brins de l'ADN<sup>150</sup>. Ceci suggère que ce que nous avons mesuré par le test des comètes correspondait



principalement à des cassures double brins non réparées. De manière intéressante, nous n'avons pas retrouvé plus de cassures résiduelles de l'ADN après traitement par RIT alpha ou doxorubicine pour les lignées U266 et LP1. Plusieurs hypothèses permettraient d'expliquer cette observation. Une première hypothèse serait que les cellules détruites par la RIT alpha disparaissent rapidement, et que les cellules survivantes réparent avant 24 heures. Une deuxième hypothèse suggère que la réparation des dégâts de l'ADN survient pendant l'irradiation à bas débit de dose que représente la RIT alpha. Une étude à des temps plus précoces pourrait permettre de mieux analyser la cinétique de l'induction de cassures de l'ADN et de leur réparation. Il faut signaler toutefois que les contraintes techniques (la délivrance de la pleine dose d'irradiation nécessite plusieurs heures) empêche l'analyse des phénomènes d'apoptose précoce, tout comme l'analyse des cassures de l'ADN.

Parmi les autres mécanismes de radiosensibilisation, une synergie dans l'induction de l'apoptose a souvent été recherchée. Des études chez l'animal ont montré que l'effet antitumoral du paclitaxel semblait plutôt corrélé à l'induction d'apoptose qu'à des modifications du cycle cellulaire<sup>179</sup>. Le paclitaxel est capable d'induire les mécanismes de l'apoptose cellulaire par la phosphorylation de BCL2<sup>180,181</sup>, et particulièrement sur les lignées de myélome multiple<sup>182,183</sup>. La doxorubicine agit aussi par des mécanismes apoptotiques<sup>184</sup>. Nous avons alors soulevé l'hypothèse que les effet radiosensibilisants de ces deux chimiothérapies vis-à-vis de la RIT alpha impliquaient des mécanismes apoptotiques. Une plus forte apoptose a été notée pour LP1 et RPMI 8226 aux doses de RIT alpha pour lesquelles une radiosensibilisation a été retrouvée. Chaque chimiothérapie a majoré le taux de cellules apoptotiques : le paclitaxel a induit un plus fort taux de cellules apoptotiques que la doxorubicine pour une mortalité cellulaire équivalente. Cependant, la combinaison de ces chimiothérapies et de la RIT alpha n'a pas majoré le pourcentage de cellules apoptotiques. L'apoptose n'est pas intervenue dans les mécanismes de la radiosensibilisation de l'irradiation alpha.

## 5.6 Combinaison RIT alpha et gemcitabine

Nos résultats ont montré que la gemcitabine pouvait majorer les effets de l'irradiation gamma, mais pas ceux de l'irradiation alpha, pour deux lignées de myélome multiple.

Plusieurs hypothèses liées aux mécanismes d'action de la gemcitabine et des rayonnements ionisants de bas et haut TEL pourraient expliquer l'absence de radiosensibilisation de la gemcitabine avec les particules alpha : importance des effets sur le cycle cellulaire, influence des dommages radioinduits et donc des mécanismes de réparation mis en œuvre, apoptose radioinduite ou encore implications de certaines voies de transduction du signal. Nous avons privilégié les études de l'apoptose en raison des difficultés d'analyse des dommages radioinduits liés aux contraintes de débit de dose de l'irradiation.

En ce qui concerne l'importance du cycle cellulaire, les cellules en phase S sont classiquement considérées comme radiorésistantes en comparaison avec les cellules en phase G0-G1 ou G2-M<sup>185</sup>. Les ions lourds ont montré une meilleure efficacité biologique relative que les rayonnements X ou gamma et semblent plus efficaces que les particules de faible TEL pour surmonter cette radiorésistance de la phase S<sup>186</sup>. Étant donné que la gemcitabine induit essentiellement une mort cellulaire dans la phase S du cycle cellulaire, Latz *et coll.*<sup>187</sup> ont suggéré que l'association de la gemcitabine et d'une irradiation utilisant des particules de haut TEL permettrait de mieux combattre cette radiorésistance des cellules en phase S. Dans ce but, nous avons tout d'abord vérifié que ces trois lignées présentaient un blocage en phase S de manière équivalente après exposition à la gemcitabine. En effet, différents auteurs ont montré que l'effet synergique de la gemcitabine pouvait être lié à un blocage en phase S précoce, radiosensible, alors que les lignées non sensibilisées par la gemcitabine ne s'arrêtaient pas en phase S précoce, mais plutôt en phase S tardive ou en phase G1<sup>187,188</sup>. Puis nous avons montré que la gemcitabine induisait une mortalité cellulaire équivalente des 3 lignées. Par contre, nos résultats ne confirment pas l'hypothèse de Latz *et coll.*, puisque aucun effet synergique n'a pu être mis en évidence avec la RIT alpha alors qu'un effet synergique avec les rayonnements gamma était noté. Ceci est d'autant plus important pour la lignée

RPMI 8226 qui n'a pas été radiosensibilisée en présence de gemcitabine, ni avec une irradiation gamma, ni avec une irradiation alpha.

Pour comprendre les mécanismes potentiellement impliqués dans cette différence de radiosensibilisation, nous nous sommes focalisés sur l'apoptose induite par les 2 types de rayonnements en association avec la gemcitabine. La gemcitabine a provoqué l'induction d'apoptose, à un niveau compris entre 1,5 et 2 fois le témoin pour les 3 lignées. L'irradiation gamma a provoqué une apoptose peu élevée à un niveau comparable pour les 3 lignées. Pour les lignées LP1 et U266, un traitement successif par gemcitabine puis irradiation gamma a entraîné un plus fort taux d'apoptose en même temps qu'était noté un effet synergique radiosensibilisant. Par contre la lignée RPMI 8226 n'a présenté ni de radiosensibilisation, ni de majoration du taux d'apoptose. L'action de la gemcitabine implique des mécanismes apoptotiques pour un grand nombre de lignées<sup>189-191</sup>. Lawrence a montré que l'apoptose peut contribuer significativement à la radiosensibilisation par la gemcitabine<sup>151</sup>. Toutefois, ce mécanisme dépendait de la lignée cellulaire plutôt que de représenter une propriété générale. Ici, pour les 3 lignées d'origine hématopoïétiques que nous avons retenues, ce mécanisme paraît capable d'expliquer l'origine de la radiosensibilisation des effets des photons gamma par la gemcitabine. Cet effet pourrait être plus important pour les cellules d'origine hématopoïétique, pour lesquelles l'apoptose est une voie préférentielle de réponse aux rayonnements ionisants. Enfin, la gemcitabine a récemment été impliquée comme un potentialisateur de l'apoptose induite par les céramides dans le cancer pancréatique<sup>192</sup>. Les céramides sont reconnus comme étant des messagers de l'apoptose radioinduite par les rayonnements de faible TEL. L'étude de cette voie des céramides semble intéressante pour les lignées cellulaires pour lesquelles l'association de la radiothérapie externe avec la gemcitabine passe par des voies apoptotiques.

D'autres mécanismes à cette absence d'effet synergique avec les particules de haut LET doivent toutefois être invoqués. En effet, ces deux types de rayonnement présentent des caractéristiques physiques propres et induisent des effets cellulaires extrêmement différents. Des études ont montré que les particules de haut TEL pouvaient induire la formation de courts fragments d'ADN (<1000 paires de bases)<sup>193</sup>, ce qui provient de la formation de cassures double brins non aléatoires<sup>194</sup>. Plus le TEL augmente, et plus la formation de cassures doubles brins augmente si on irradie des cellules à des particules alpha ou à des ions

lourds<sup>56,195</sup>. De plus, les cassures double brin induites par les particules de haut TEL sont plus complexes et moins rapidement réparées que celles induites par les particules de TEL faible<sup>55,56</sup>. La gemcitabine pourrait interférer avec la réparation des dommages radioinduits de l'ADN, particulièrement la réparation des cassures double brin de l'ADN. Chez les mammifères, la réparation non-homologue est le mécanisme principal de réparation des cassures double brin de l'ADN radioinduites<sup>196</sup>, mais ce mécanisme ne semble pas être impliqué dans la radiosensibilisation par la gemcitabine<sup>197</sup>. À l'inverse, la gemcitabine interfère préférentiellement avec la recombinaison homologue<sup>198</sup>. Ces différents travaux et nos résultats nous permettent d'évoquer l'hypothèse que la recombinaison homologue ne serait pas le mécanisme essentiel de la réparation des cassures de l'ADN causés par une irradiation de haut TEL.

En guise de conclusion, la synergie d'effet entre gemcitabine et rayonnements ionisants ne peut donc pas être généralisée à l'ensemble des émissions alpha, bêta et gamma-X. D'un point de vue mécanistique, plusieurs hypothèses peuvent être évoquées, mais cette différence pourrait être expliquée par un plus fort taux d'apoptose après traitement combiné de la gemcitabine avec une irradiation gamma en comparaison avec une irradiation alpha.

## 5.7 Voies de transductions du signal : résultats préliminaires

Les rayonnements ionisants déclenchent à l'intérieur des cellules irradiées des mécanismes moléculaires actifs succédant aux étapes physico-chimiques précoces qui peuvent aboutir à une mort de type mitotique ou apoptotique. Ces mécanismes intracellulaires sont déclenchés non seulement par les lésions radioinduites de l'ADN, mais aussi par des phénomènes membranaires à l'origine d'une transduction du signal aboutissant à des phénomènes d'apoptose, d'arrêt de cycle et d'inhibition de prolifération. De nombreuses données font état de l'influence de la génération de céramides, et de l'activation de certains récepteurs membranaires par une irradiation gamma. Peu de données sont disponibles concernant ces phénomènes après irradiation alpha<sup>47,56</sup>.

La molécule RAS occupe une place centrale dans ces voies de transduction, à la fois comme facteur de transformation néoplasique et comme facteur de radiorésistance à une irradiation photonique<sup>81,83-87</sup>. Cette molécule occupe une place importante dans la physiopathologie du myélome multiple puisqu'une mutation activatrice est notée dans 54,4 % des myélomes au diagnostic et 81 % des myélomes en rechute<sup>67</sup>. De plus, récemment, la protéine RAN, GTPase membre de la famille RAS a été impliquée dans pathophysiologie du myélome multiple<sup>115</sup>. Enfin, des modulateurs des voies de signalisation de RAS voient le jour, que ce soit des inhibiteurs peu spécifiques de la farnésylation des protéines de la familles RAS<sup>68-70</sup> ou de voies plus en aval.

Puisque nous avons montré que la RIT alpha induisait des phénomènes d'apoptose et de réduction de la prolifération et que des différences importantes étaient notées entre les lignées cellulaires de myélome multiple alors qu'une irradiation gamma mettait en évidence moins de différences, l'étude des voies de signalisation en aval de RAS nous a semblé opportune. Notre stratégie a consisté à étudier l'activation protéique à différents temps après l'irradiation alpha, en comparant attentivement les réponses des lignées LP1 et U266 présentant des réponses à la fois en termes d'apoptose, de survie clonogénique et de réduction de prolifération différentes, alors qu'elle présentaient toutes deux un gène *ras* non muté. Nous avons toujours mesuré ces phénomènes en comparaison avec une irradiation gamma qui nous

a servi de référence avec une dosimétrie précise. Nous avons débuté une approche de ces phénomènes moléculaires dans un premier temps par une étude des modifications protéiques induites par l'irradiation alpha en comparaison avec une irradiation gamma, puis dans un deuxième temps en surexprimant l'oncogène *ras*.

Parmi les nombreuses voies modulées par les rayonnements, l'activation des MAPK après irradiation photonique joue un rôle important dans la réponse aux rayonnements ionisants en contrôlant la survie cellulaire et la repopulation après irradiation (pour revue <sup>59</sup>). Afin d'évaluer l'implication des voies de transduction du signal en réponses aux particules de haut TEL, nous avons étudié la phosphorylation des protéines RAF-1, ERK 1/2, p38 et AKT après irradiation gamma ou alpha de deux lignées cellulaires LP1 et U266, choisies en raison de leur différence de radiosensibilité à la RIT alpha.

La première étape de notre analyse a montré une implication des voies MAPkinase et PI3kinase -AKT dans la réponse à une irradiation alpha, et que l'amplitude de cette activation protéique dépendait de la dose d'irradiation et de la lignée cellulaire. Ces résultats sont résumés de façon simplifiée dans le tableau suivant (Tableau 16).

*Tableau 16 : Rappel simplifié des activation protéiques de LP1 et U266 après irradiation gamma ou alpha*

	LP1				U266			
	4 Gy		12 Gy		4 Gy		12 Gy	
gamma	taux	délai	taux	délai	taux	délai	taux	délai
ERK 1/2	x 2	30'	x 1,7	15'	x 1,5	15'	x 2	15'
p38	x 3	30'	x 6	30'	x 1,7	30'	/ 5	60'
AKT	x 2	30'	x 2	15'	inchangé		inchangé	
RAF1	x 2,5	30'	x 2,5	15'	x 2	30'	inchangé	
alpha	0,7 Gy		4 Gy		1,3 Gy		5,2 Gy	
	taux	délai	taux	délai	taux	délai	taux	délai
ERK 1/2	x 1,4	30'	x 1,2	30'	/ 5	60'	/ 2	60'
p38	x 1,4	60'	x 1,6	30'	inchangé		inchangé	
AKT	quasi inchangé		quasi inchangé		x 1,5	30'	x 2,7	15'
RAF1	x 1,7	30'	x 1,4	30'	x 2,7	15'	x 2,4	30'

Une irradiation gamma à faible dose a activé les voies de transduction du signal pour LP1 et U266, à un niveau comparable pour ERK 1/2, p38 ou RAF-1, et à un niveau plus faible pour AKT. À plus forte dose, des variations d'amplitude globalement comparables aux variations à faible dose sont observées mais dans un délai plus court. Pour U266 à forte dose, une réduction de la phosphorylation de p38 et une stabilité de RAF-1 contraste avec les résultats obtenus à faible dose. En parallèle, aucune différence n'a été mise en évidence, entre les deux lignées, tant en termes de survie cellulaire, qu'en termes d'apoptose radioinduite (Figure 22 et Figure 24 ). Cette activation des voies de transduction du signal après irradiation gamma confirme les données largement décrites pour d'autres lignées (pour revue<sup>59,87</sup>).

L'étude de ces voies de transduction prend tout son intérêt dans la réponse cellulaire aux particules alpha. Après calculs dosimétriques, nos résultats ont montré que la lignée U266 était plus résistante aux rayonnements alpha que la lignée LP1. Or, contrairement à ce que l'on observe après irradiation gamma, il existe une forte différence entre les deux lignées cellulaires en termes de phosphorylation de la protéine AKT qui est hyperphosphorylée sur la sérine 473 dans la lignée U266 la plus résistante aux particules alpha. Par contraste, l'activation modérée de ERK 1/2 et p38 pour LP1 n'a pas été observée pour U266, avec une stabilité voire une décroissance du niveau de phosphorylation. RAF-1 est activé de manière comparable pour LP1 et U266. AKT apparaît comme un régulateur de nombreux processus biologiques comme la prolifération, la survie cellulaire et l'apoptose (pour revue<sup>199</sup>). D'autre part, cette voie PI3Kinase-AKT apparaît comme une voie majeure de survie et de prolifération dans le myélome multiple<sup>79,80</sup>. Ainsi, la protéine AKT pourrait jouer un rôle important dans la réponse à une irradiation alpha: son inactivation après irradiation serait liée à une induction d'apoptose et une radiosensibilité plus marquée. En effet, lorsque AKT est activée après irradiation gamma sur LP1 et U266 (quoique faiblement), et lors de l'irradiation alpha pour U266, le taux d'apoptose ne varie pas (*cf.* Figure 24). En revanche, en parallèle à l'absence d'activation d'AKT après irradiation alpha de LP1, une apoptose apparaît ainsi qu'une plus grande radiosensibilité par rapport à la lignée U266.

L'importance de la dose d'irradiation alpha est moins nette que pour l'irradiation gamma, tant en termes d'amplitude de phosphorylation que de délai d'apparition de l'effet. Comme nous l'avons souligné, l'irradiation à bas débit de dose que représente l'irradiation alpha pose le problème du délai de dépôt de la dose qui nécessite près de 3 heures pour que l'essentiel de l'activité soit déposé dans le cas du bismuth 213. Il nous sera nécessaire de changer de modèle d'irradiation alpha par l'utilisation d'un faisceau d'irradiation alpha, afin de réellement comparer les effets des deux types de rayonnement, tant en termes de dose que de délai d'apparition des activations protéiques. Malgré ces réserves, ces résultats préliminaires ont apporté deux informations non décrites dans la littérature : d'une part une induction de voies de transduction du signal en aval de RAS, après irradiation alpha, et d'autre part un lien potentiel entre l'activation d'AKT et une moindre sensibilité à l'irradiation alpha, à la différence de l'irradiation gamma.

Ces activations de signaux de transduction du signal ne signifient pas nécessairement que des phénomènes exclusivement membranaires sont à l'origine de ces phosphorylations. La frontière effets nucléaires-effets cytoplasmiques des rayonnements ionisants semble largement perméable. Par exemple, une activation de la voie des MAPK a été reliée avec des phénomènes nucléaires (via c-Abl) et non membranaires (pour revue<sup>200</sup>), et à l'inverse des phénomènes nucléaires sont inductibles par des voies de transduction du signal cytoplasmique (pour revue<sup>52</sup>). Pour avancer plus loin dans cette analyse des phénomènes impliqués dans ces activations de voies de transduction du signal, une étude en situation où la protéine RAS est surexprimée ou activée en permanence d'une part, et d'autre part à l'analyse des effets d'inhibiteurs des voies de transduction du signal a été nécessaire.

Dans ce but, nous avons mené des travaux de surexpression de l'oncogène *K-ras*. Nos résultats ont confirmé l'implication des protéines membranaires dans la réponse aux rayonnements ionisants. Nous avons alors transfecté l'oncogène *K-ras 4B* dans la lignée U266. Les cellules transfectées sont plus résistantes à la réduction de prolifération induite par l'irradiation alpha tout comme après irradiation gamma. -RAS est une protéine G ancrée à la membrane qui, après fixation de GTP, initie plusieurs cascades moléculaires dont la voie PI3 kinase-AKT<sup>74</sup>. Lorsqu'elle est mutée, la protéine K-RAS est incapable d'hydrolyser le GTP et ce qui la maintient sous sa forme active. En rapprochant les résultats menés sur l'activité



protéique et sur K-RAS après irradiation, nous pouvons émettre l'hypothèse que la réponse aux rayonnements ionisants met en jeu la protéine K-RAS et une de ses voies en aval, la voie PI3Kinase-AKT. Les rayonnements induiraient une augmentation de l'activité de K-RAS qui initierait la voie PI3Kinase-AKT ; cette voie engendrerait la radioprotection des cellules en activant des voies de prolifération et d'inhibition d'apoptose. Bien entendu, des analyses plus fines s'imposent à travers une transfection réussie de la forme mutée de la protéine et de la comparaison avec la forme 4A et l'analyse de leur retentissement sur la prolifération, l'apoptose et la mort clonogénique des cellules d'une part, et d'autre part à l'inhibition des voies en aval de K-RAS de façon à inhiber ou majorer la radiorésistance.

## 6 Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse apporte un nouvel éclairage sur les effets biologiques de la radioimmunothérapie alpha. Une irradiation alpha engendre des phénomènes complexes non exclusivement nucléaires aboutissant à la mort cellulaire à travers des mécanismes actifs comme l'apoptose, susceptibles d'être modulés par des molécules radiosensibilisantes comme le paclitaxel ou la doxorubicine, et pouvant impliquer des voies de transduction membranaires du signal comme AKT. Ceci transforme la vision balistique simple des effets des particules alpha à type de « magic bullet » traversant la cellule en la détruisant immédiatement. Les effets ciblés d'une telle irradiation étaient particulièrement bien adaptés à ce modèle de tumeurs à cellules isolées que représente le myélome multiple que nous avons isolé, à l'aide d'un vecteur de haute affinité comme l'anticorps B-B4 pour une cible largement représentée comme syndecan-1, notamment en comparaison avec une irradiation bêta ou gamma.

Trois grands axes de travail peuvent se dégager, l'un sur un versant concernant une optimisation de la technique de radioimmunothérapie alpha, l'autre sur un versant plus fondamental pour une meilleure compréhension des mécanismes d'une irradiation alpha, et le dernier axe plus appliqué pouvant aboutir à une utilisation clinique.

Dans une première approche, une optimisation de la RIT alpha du myélome multiple semble nécessaire, à la fois pour ce qui concerne le radioélément et pour ce qui concerne le vecteur.

Pour le versant radioélément, la difficulté majeure a résidé dans la faible disponibilité de générateurs d'actinium 225 fournis par l'Institut des TransUraniens de Karlsruhe. En effet, nous avons dû réaliser l'ensemble des expériences non seulement sur un temps limité de une à deux semaines selon l'activité du générateur mais aussi à raison de 2 à 3 générateurs par an. De plus, d'un point de vue clinique, la demi-vie du  $^{213}\text{Bi}$  pourrait être une limite si les paramètres pharmacocinétiques du vecteur sont défavorables. Au sein de l'échantillonnage de radioéléments émetteurs alpha disponibles, trois semblent intéressants : l'actinium 225, le

bismuth 212 et enfin l'astate 211. L'actinium 225, élément père du Bismuth 213, qui possède une demi-vie longue de 10 jours peut être utilisé depuis la mise au point d'un agent chélatant satisfaisant dérivé du DOTA. L'équipe de Scheinberg du Memorial Sloan-Kettering Cancer Center a mis à profit l'internalisation de l'anticorps marqué pour réaliser une irradiation interne de la cellule avec une grande efficacité. Le problème pourrait venir de la circulation des descendants de l'actinium 225 dans l'organisme. Le bismuth 212 a fait l'objet de nombreuses études mais son utilisation est limitée en raison de problèmes de radioprotection liés à des émissions photoniques de hautes énergies. Notre groupe s'est donc intéressé à l'astate 211 qui présente une demi-vie attractive de 7,2 heures ainsi qu'une émission  $\alpha$  permettant la réalisation d'une imagerie. Largement décrite dans la littérature, son utilisation est limitée du fait de sa production en cyclotron. Nantes devrait disposer à l'horizon 2008 d'un cyclotron de haute énergie, capable en particulier de produire de l'astate 211. Cette perspective nous oriente naturellement vers ce radioélément et nous nous attelons à l'élaboration des procédures de production en collaboration avec le CERI d'Orléans, de purification en collaboration avec le groupe de radiochimie du laboratoire Subatech de l'école des Mines de Nantes et enfin le couplage par l'intermédiaire de précurseurs stanniques qui sont développés au sein de notre laboratoire.

Pour le versant vecteur, une distribution rapide dans l'organisme est nécessaire lors de l'utilisation de radioélément à demi-vie courte comme le bismuth 213. Pour accélérer ce ciblage, une stratégie de RIT en 2 ou 3 temps (*cf.* 1.1.3.2) semble particulièrement bien adaptée. Cette optimisation ne peut être étudiée que par des modèles animaux de myélome multiple. Le modèle de xénogreffes de plasmocytome chez la souris SCID<sup>201</sup> n'est pas adapté à l'étude de la RIT alpha puisque ce modèle se présente sous la forme de tumeurs macroscopiques ce qui ne reproduit pas le modèle de cellules malignes disséminées observé chez l'homme. Le modèle de myélome murin 5T2 MM<sup>202</sup> ou 5T33<sup>203</sup> se développe chez la souris d'une manière proche du développement humain, avec une diffusion systémique de la maladie et la production d'une paraprotéine dosable. Toutefois ce résultat n'est pas adapté à notre modèle de radioimmunothérapie car B-B4 ne reconnaît pas syndécan-1 murin. Deux stratégies peuvent alors être envisagées : transfecter syndécan-1 humain dans un modèle myélome murin syngénique, ou bien utiliser un anticorps reconnaissant syndécan-1 murin. Concernant la première stratégie, nous avons tenté le développement d'un modèle murin 5T33 surexprimant syndécan-1 humain. Le vecteur a pu être cloné et transfecté avec succès dans la lignée CHO ou dans la lignée COS, mais aucune tentative de transfection dans la

lignée 5T33 que ce soit par lipofectamine ou nucleofactor n'a pu aboutir. Une méthodologie basée sur l'utilisation de rétro-virus devrait être mise en œuvre au cours des prochains mois. Quand bien même ces tentatives aboutissaient, une immunisation anti-syndécan 1 serait à craindre chez ces souris immunocompétentes. Concernant la deuxième stratégie, un anticorps de rat anti-syndécan 1 murin est en cours de développement au sein de notre laboratoire afin de mettre au point un modèle murin de radioimmunothérapie du myélome multiple, en particulier pour rendre possible des études de pharmacocinétiques de l'anticorps complet mais aussi de fragments F(ab')<sub>2</sub>.

Dans une deuxième approche, ce travail de thèse ouvre des voies de recherche plus fondamentales concernant d'une part les interactions des chimiothérapies antimitotiques avec une irradiation alpha, et d'autres parts les voies membranaires de transduction du signal.

L'interaction synergique entre paclitaxel et irradiation alpha implique qu'il existe des mécanismes d'action communs. Au-delà des mécanismes reconnus comme l'interaction avec le cycle cellulaire, des liens entre l'efficacité des rayonnements ionisants et une interaction avec le cytosquelette semblent se dessiner, surtout en relation avec la mitochondrie pour ce qui concerne des phénomènes d'apoptose cellulaire. L'interaction synergique entre la gemcitabine et une irradiation gamma et simplement additive avec l'irradiation alpha pourrait être expliquée par l'implication de mécanismes de réparation des lésions radioinduites de l'ADN différents pour chaque type d'irradiation. Il paraît légitime de soupçonner que la recombinaison homologue ne serait pas le mécanisme essentiel de la réparation des cassures de l'ADN causés par une irradiation de haut TEL puisque la gemcitabine inhibe la recombinaison homologue. Malheureusement, notre outil actuel, la radioimmunothérapie alpha, autorise difficilement une exploration plus poussée de ces mécanismes, car le bas débit de dose d'une part contraint à attendre que le dépôt d'énergie soit suffisant pour espérer observer un effet sur la réparation de l'ADN alors que ces mécanismes agissent dans un délai bref, et d'autre part pose le problème de la radioprotection des expérimentations réalisées avant décroissance suffisante du radioélément. Pour cela, nous envisageons un recours à un faisceau homogène de particules alpha de haute énergie qui proviendra du cyclotron en cours d'installation à Nantes. Nous pourrions alors mesurer les effets d'une irradiation alpha à haut débit de dose aisément reproductible et de disponibilité plus aisée. L'étude des effets de la combinaison irradiation alpha et gemcitabine sur des lignées présentant des mutations

précises de gènes impliqués dans les différents mécanismes de réparation cellulaire permettrait de répondre en partie à cette hypothèse.

Nos résultats suggèrent par ailleurs que l'irradiation alpha implique des phénomènes membranaires induisant des mécanismes de transduction du signal, comme AKT. Notre travail est largement préliminaire et s'est poursuivi par le travail de mastère de Melle Sophie Sadot, sous la conduite du Dr Michel Chérel au sein de notre laboratoire. Ses résultats ont confirmé une activation de la voie PI3K-AKT après irradiation alpha. Le blocage pharmacologique de cette voie par la wortmannin ou le LY294002 induit une baisse de la prolifération cellulaire et une augmentation de la phosphorylation de la protéine ERK 1/2. Au contraire, l'inhibition de la voie MAPK-ERK influence très peu la prolifération cellulaire et n'entraîne pas d'activation compensatrice de la voie PI3K-AKT. Malgré l'inhibition de chacune de ces voies, la radiorésistance à la RIT alpha induite par K-RAS persiste. L'étude fine de ces voies d'activation nécessiterait une inhibition plus spécifique de chacune des voies, à l'aide par exemple de l'utilisation de siRNA. Une analyse des niveaux d'expression génique des différentes voies de transduction du signal, par puce à ADN est par ailleurs prévue en collaboration avec l'Unité Mixte de Génomique du Cancer de l'Institut Régional du Cancer Nantes-Atlantique.

Enfin, dans une dernière approche, avant d'envisager une utilisation clinique de nos résultats, plusieurs étapes seront nécessaires. Une première étape concerne la validation d'un modèle pré-clinique notamment murin. Ce modèle permettrait non seulement de valider *in vivo* le concept de RIT alpha du myélome multiple et de tester les combinaisons avec des chimiothérapies radiosensibilisantes, mais aussi de faciliter une optimisation de la technique. Une deuxième étape avant une étude de phase I de RIT alpha nécessite de valider le concept de ciblage tumoral des cellules myélomateuses chez des patients malades, sans qu'une fixation potentiellement toxique ne soit à craindre. Nos résultats laissent craindre essentiellement une fixation pulmonaire de l'anticorps. Des immunoscintigraphies à l'aide de B-B4 radiomarqué à l'indium 111 ont été rapportées chez quelques patients anglais, avec une bonne tolérance de l'injection de l'anticorps<sup>204</sup>. Selon cette étude, une fixation sur le squelette était visualisée traduisant un ciblage tumoral, ainsi qu'une fixation hépatique potentiellement liée à l'utilisation de l'indium 111. Afin de mettre en application les résultats de ce travail de thèse, nous avons développé une étude de phase I de RIT bêta du myélome multiple à l'aide

de l'anticorps B-B4 marqué à l'iode 131. Cette étude inclura des patients en 4<sup>ème</sup> ligne thérapeutique présentant un myélome multiple en échec ou progression après chimiothérapie conventionnelle ou intensifiée suivie de thalidomide puis de bortezomid. L'objectif principal sera de déterminer la dose maximale tolérée par l'organisme sans avoir recours à une autogreffe de moelle osseuse. Pour cela nous aurons recours à une escalade de dose selon la méthode de Fariès. Les objectifs secondaires seront de déterminer les caractéristiques pharmacocinétiques de l'anticorps ainsi que de mesurer sa fixation dans l'organisme à l'aide d'immunosciintigraphies pouvant autoriser un calcul dosimétrique. Après l'acceptation en juillet 2005 de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé, puis l'acceptation en août 2005 par le Comité Consultatif de Protection des Personnes pour la Recherche Biomédicale de Nantes, cette étude financée par une Action Concertée Incitative du Ministère de la Recherche débute en ce moment.

Ced n'est que si cette étude démontre une reconnaissance tumorale par l'anticorps d'une part et l'absence de toxicité extra-hématologique rédhibitoire d'autre part, qu'une étude de phase I de RIT alpha du myélome multiple pourra être envisagée.

## Liste des Abréviations

- AcM : Anticorps Monoclonal
- ACSH : Autogreffe de Cellules Souches Hématopoïétiques
- ADN : Acide DesoxyriboNucléique
- ARN : Acide Ribonucléique
- ATP : Adénosine Tri Phosphate
- BCA : Acide BiCinchoninic
- Bq : Béquerel
- CD : Classe de Différenciation
- CHX-A''-DTPA : 2-(p-isothiocyanatobenzyl) (p-SCN-Bz)-cyclohexyldiethylenetriaminepenta acetic acid ligand
- CMV : CitoMegaloVirus
- dCTP : désoxyCytidine TriPhosphate
- dNTP : Déoxy nucléotide triphosphate
- DOX : doxorubicine
- DXM : dexamethasone
- EDTA : acide éthylènediaminotétraacétique sel disodique
- EGF : Epidermal Growth Factor
- ERK : Extracellular Regulated Kinase
- Fc : fraction constante
- FTI : Farnesyl Transferase Inhibitor
- GDP : Guanosine Di-Phosphate
- GFP : Green Fluorescent Protein
- GM-CSF : Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor
- GMZ : gemcitabine (GEMZAR®)
- GTP : Guanosine Tri-Phosphate
- GVM : GRAFt Versus Myeloma
- IC : Indice de Combinaison
- ICT : irradiation corporelle totale
- Ig : Immunoglobuline
- IL-6 : InterLeukine-6
- JNK : c-Jun NH2-terminal Kinase
- MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
- MHD : Méphalan à Haute Dose
- MID : Moyenne d'Inactivation de Dose
- MM : Myélome Multiple
- ND : Non Déterminé
- PBS : Phosphate Buffer Saline
- pBSSK+ : pBlueScript SK+
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
- PDK : 3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase
- pEGFP : Plasmide Enhanced Green Fluorescent Protein gene
- PI3K : PhosphatidyInositol 3 Kinase
- PKB : Protein Kinase B
- PMSF : phenyl methyl sulfonyl fluoride

- PRL : Phosphatase of Regenerating Liver
- PVDF : PolyVinylidène DiFluoride
- RER : Radiation Enhancement Ratio
- RIT : RadioImmunoThérapie
- RT : Reverse Transcription
- SAPK : Stress Activated Protein Kinase
- SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
- Ser : Sérine
- SVF : Sérum de Veau Fétal
- TAE : Tris Acetate EDTA
- TBS : Tris Buffer Saline
- TE : Tris EDTA
- TEL : Transfert d'Energie Linéique
- Thr : thréonine
- Tyr : Tyrosine
- TXL : Taxol
- UV : Ultra Violet
- VAD : Vincristine, Anthracyclines, Dexaméthasone
- VADM : Vincristine, Anthracyclines, Dexaméthasone, Méthylprédnisolone
- VLB : vinblastine



# **Documents scientifiques élaborés à partir de ce travail de thèse**

## **8.1 Article 1**

## Comparison of the Biologic Effects of MA5 and B-B4 Monoclonal Antibody Labeled with Iodine-131 and Bismuth-213 on Multiple Myeloma

Stephane Supiot, M.D.<sup>1</sup>  
Alain Faivre-Chauvet, Ph.D.<sup>1</sup>  
Olivier Couturier, M.D.<sup>1</sup>  
Marie Françoise Heymann, M.D., Ph.D.<sup>2</sup>  
Nelly Robillard<sup>3</sup>  
Françoise Kraeber-Bodéré, M.D., Ph.D.<sup>1</sup>  
Laurence Morandau, Ph.D.<sup>1</sup>  
Marc André Mahé, M.D., Ph.D.<sup>4</sup>  
Michel Chérel, Ph.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM U463, Institut de Biologie, Nantes, France.

<sup>2</sup> Service d'Anatomie-pathologie, Hôpital Guillaume et René Laënnec, Nantes, France.

<sup>3</sup> Service Commun de Cytométrie, University Hospital, Institut de Biologie, Nantes, France.

<sup>4</sup> Centre René Gauducheau, Saint-Herblain, France.

Presented at the Eighth Conference on Radioimmunodetection and Radioimmunotherapy of Cancer, Princeton, New Jersey, October 12-14, 2000.

The authors thank Catherine Sai-Maurel, Jean Le Botierff, and James Gray for their technical assistance and M. Bardies for helpful discussion.

Address for reprints: Michel Chérel, Ph.D., INSERM U463, Institut de Biologie, 9 Quai Moncoussu, 44093 Nantes Cedex 10, France; Fax: (33)-2-40-35-66-97. E-mail: mchere@nantes.inserm.fr

Received October 31, 2001; accepted November 14, 2001.

© 2002 American Cancer Society

**BACKGROUND.** Using a specific monoclonal antibody (MAb), B-B4, coupled to bismuth-213 (<sup>213</sup>Bi) by a chelating agent (CITC-DTPA), the feasibility of alpha-radioimmunotherapy (RIT) for multiple myeloma (MM) has been demonstrated previously. **METHODS.** In this study, the two MAbs tested, MA5 and B-B4, target the epithelial antigens Muc-1 and syndecan-1, respectively, which are both expressed by MM cell lines. Antibody characterization was evaluated by flow cytometric analysis of normal and tumoral hematopoietic cells of MM patients as well as immunohistochemical tests of normal, nonhematopoietic tissues. Radiobiologic effects were evaluated for <sup>213</sup>Bi- and iodine-131 (<sup>131</sup>I)-labeled antibodies. We assessed in vitro mortality (thymidine incorporation, MTT, and clonogenic assays) and cell cycle modifications with propidium iodide staining. These tests were performed on MM cell lines until 120 hours postirradiation at several time points, using radiolabeled antibody concentrations ranging from 0.5 to 20 nM and specific activities ranging from 240 to 1200 MBq/mg of MAb.

**RESULTS.** MA5 stained all MM cells in only 50% of patients, whereas B-B4 recognized all MM cells in all patients. B-B4 principally showed hepatic, pulmonary, and duodenal staining, whereas MA5 marked renal and pulmonary tissues. RIT with <sup>213</sup>Bi-B-B4 induced specific mortality and G<sub>2</sub>/M phase cell cycle arrest, which depended on the concentrations and specific activity. For <sup>213</sup>Bi-MA5, this arrest appeared at concentrations above 10 nM, an amount fivefold higher than the required with B-B4. This difference was also found in thymidine incorporation assays. Furthermore, with <sup>213</sup>Bi-B-B4, the arrest at the G<sub>2</sub>/M phase appeared quickly, within 24 hours after irradiation, and affected up to 60% of the cells (for 2 nM of <sup>213</sup>Bi-B-B4 at 1,200 MBq/mg). Conversely, <sup>131</sup>I-B-B4 had a very limited effect on cell mortality and did not induce any cell cycle arrest.

**CONCLUSIONS.** The results of this study show that B-B4 might be the more effective therapeutic antibody and suggest that alpha-RIT might be more suitable than beta-RIT for treating single-cell tumor models. Thus, these findings set the stage for the beginning of clinical trials using alpha-emitter-radiolabeled B-B4, with special attention paid to hepatic, pulmonary, and intestinal side effects. *Cancer* 2002;94:1202-9. © 2002 American Cancer Society.

DOI: 10.1002/encr.10286

**KEYWORDS:** radioimmunotherapy, multiple myeloma, bismuth-213, iodine-131, syndecan-1, Muc1, cell cycle.

Multiple myeloma is responsible for 1% of cancer-related death and represents 10% of malignant blood diseases. For the majority of patients, multiple myeloma is an incurable disease with very poor prognosis and a median survival of about 30 months.<sup>1</sup>

Radioimmunotherapy (RIT) has proved efficient in the treatment of radiosensitive tumors such as non-Hodgkin lymphoma, but it is less suitable for more radioresistant solid tumors.<sup>2</sup> Several methodologic approaches intended to improve RIT efficacy are under evaluation. One involves optimizing the use of radionuclides—for instance, by replacing iodine 131 (<sup>131</sup>I), which has been widely used until now, with a more suitable radioisotope, such as yttrium 90. This isotope is particularly useful for lymphomas, which are often treated only when the tumor mass has become large. In the case of multiple myeloma, cells are found either isolated in bone marrow or in small clusters. Among the different beta-emitters available, it would be logical to choose <sup>131</sup>I for the treatment of multiple myeloma because the energy of the beta particles emitted is distributed within a range of about a millimeter, whereas more energetic beta-emitters (yttrium-90, rhenium-186 and -188) deliver their energy over a greater range. However, the notion of energy deposition is not the only parameter to consider; high gamma emission, physical half-life, or the coupling technique used can make the choice of a suitable radionuclide more complicated. For instance, in the case of isolated tumor cells, alpha particles have a theoretic advantage over beta particles because of their high linear energy transfer and shorter range of action. Presumably, cell destruction would be more selective and irradiation less harmful to adjacent tissues. Various studies have already demonstrated the efficacy of alpha-emitters for cell mortality,<sup>3</sup> particularly in a multiple myeloma model.<sup>4</sup> However, a review of the literature clearly showed that beta particles are most often used. Thus, it appeared that an in vitro study would be useful to determine whether alpha particles actually have a theoretic advantage over beta particles.

Improvement could also be made in the vector used, particularly within the parameters governing antigen-antibody interaction in the multiple myeloma model. Among the different antigens concerned, syndecan-1 or CD 138 is present in 100% of myeloma cells.<sup>5-8</sup> This antigen corresponds to a linking protein in the extracellular matrix. B-B4 antibody of murine origin recognizes the external part of this antigen, showing a good affinity constant of around 1 nM.<sup>4</sup> Another antigen, Muc1, is rather well represented on the surface of myeloma cells.<sup>9-11</sup> This antigen is a mucin (a type I transmembrane protein) composed of a single extracellular domain made up of repeated tandem domains.<sup>12</sup> The MA5 antibody, which recognizes this antigen, is used for the detection of breast tumor cells.<sup>13</sup> Thus, we decided that it would be in-

teresting to compare the efficacy of these two antibodies as radioimmunotherapy vectors.

The current study analyzed the effects of bismuth-213 (<sup>213</sup>Bi)- or <sup>131</sup>I-labeled MA5 and B-B4 antibodies on cell survival and the cell cycle, to compare not only the two radionuclides but also the two antibodies likely to be used in RIT protocols for multiple myeloma. This study also considered the possible combined use of two vectors in order to reduce the non-specific effects of uptake by nontarget cells.

### MATERIALS AND METHODS

#### Multiple Myeloma Model

Human myeloma cell line U266 was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD) and cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and 2 mM L-glutamine in humidified air at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Forty-eight hours before each assay, cells were transferred into fresh culture medium, and density was adjusted to 2.5 × 10<sup>5</sup> cells/mL.

#### Monoclonal Antibodies

Three monoclonal antibodies (MAbs) were used in the study: B-B4 (Diaclone Research, Besançon, France);<sup>6</sup> MA5, kindly provided by Dr. D. Goldenberg (Garden State Cancer Center, Belleville, NJ); and immunoglobulin G (IgG) 134, kindly provided by Immunotech Coulter, Marseille, France. The IgG did not react with myeloma cells and was used as a nonspecific antibody.

#### Labeling of Monoclonal Antibodies

The <sup>213</sup>Bi generator was kindly provided by the European Institute for Transuranium Elements.

#### Conjugation

B-B4, MA5, and nonspecific IgG 134 MAbs were conjugated to the bifunctional chelating agent CITC-DTPA (pentaacetic triamine diethylene p-aminobenzyl acid), which was synthesized in our laboratory using the procedure described by Brechbiel et al.<sup>14</sup>

#### Labeling Monoclonal Antibody with Bismuth-213

Radiolabeling was obtained by incubating, for 15 minutes at room temperature, 10–100 μg of MAbs-CITC-DTPA with a buffered, calibrated solution of freshly eluted <sup>213</sup>Bi, according to the method described by Kaspersen et al.<sup>15</sup>

#### Iodination

B-B4 was labeled with <sup>131</sup>I (Cis Biointernational, Gif sur Yvette, France) by the iodogen method.<sup>16</sup> Radio-

chemical purity, checked by ITLC-SG using 10% TCA as solvent, was usually > 90%.

#### Histology and Immunoperoxidase Staining

First, the best dilution of B-B4 was determined (1:400, with microwave pretreatment 3 × for 5 minutes each) on frozen and formalin-fixed breast tumors, specifically, well-differentiated infiltrating duct breast tumors and mastosis. For MA5, the suitable dilution was 1:500 (without microwave pretreatment). Next, we studied the reactions of B-B4 antibody with different normal human tissues: liver, kidney, lung, intestinal tract, and heart. All immunohistochemical reactions were performed on deparaffinized sections (4 μm) of formalin-fixed tissue samples. Sections were rehydrated through a series of staged ethanol solutions and incubated in distilled water containing 0.3% hydrogen peroxide to inhibit endogenous peroxidase. After washing, sections were incubated for 30 minutes at room temperature with primary antibody (B-B4 and MA5). Antibody-antigen complexes were revealed by avidin-biotin technique (Dako kit 0675, Trappes, France). The reaction product was visualized by incubation in AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) (Dako K 0697) for 10 minutes and then washed with water before counterstaining with Mayer hematoxylin. The slides were washed before dehydration and coverslip mounting. B-B4 and MA5 antibodies were suppressed in immunostaining for negative controls. A case of breast tumor was used as a positive control. The number of positive cells for B-B4 or MA5 (determined by systematic scanning) as well as the intensity and the location of the immunostaining (membrane cells or cytoplasm) were noted.

#### Radiobiologic Assays

For each assay, the experiment was done in quadruplicate and repeated at least twice.

<sup>3</sup>H-Thymidine proliferation assays, limited dilution analysis. These were described in our previously published report.<sup>4</sup>

#### MTT test

The cells were washed, counted, resuspended in RPMI-1640 medium containing 10% FCS at 10<sup>5</sup> cells/mL, and plated in 96-well microtiter plates at 100 μL/well. MTT reagent (5 mg/mL in phosphate-buffered saline [PBS]) was added, and cells were incubated at 37 °C for 1 hour. Then 100 μL isopropanol was added to each well, and mixed by whirling to solubilize the formazan product. Finally, the plates were read for absorbance in a spectrophotometer at 550 nm.

TABLE 1  
(A) Cytofluorimetric Analysis and (B) Histology and Immunoperoxidase Staining

		MA5	B-B4
A	Normal plasma cells	3/7 (43%)	100%
	MGUS and MM patient cells	17/30 (56%)	100%
	MM cell lines	3/3 (100%)	100%
B	Kidney		
	Tubular epithelium	M	0
	Glomerular	0	0
	Urothelium	M	M
	Smooth muscle of hilus vessels	0	0
	Liver	0	M
	Hepatocytes		
	Sinusoid endothelium	0	0
	Biliary epithelium	M	M
	Lung		
	Alveolar epithelium	M	M
	Bronchial epithelium	M	M weak
	Blood vessels	0	0
	Bronchial glands	M	M
	Duodenum		
	Crypt epithelium	0	M
	Glands	0	M
	Chorion lymphocytes	0	M
	Smooth muscle	0	0
	Blood vessels	0	0
	Heart		
	Myocytes	c weak	c

MGUS: monoclonal gammopathy of undetermined significance; MM: multiple myeloma; M: membranous staining; c: cytoplasmic staining.

#### Measurement of cell cycle distribution

To perform this measurement, 1 × 10<sup>6</sup> cells were pelleted, resuspended in 0.2 mL PBS, and fixed by the addition of 2 mL of ice-cold 70% ethanol/30% PBS. Fixed cells were pelleted, vigorously resuspended in PBS, and incubated for 30 minutes at 37 °C with 100 μg/mL RNase and 40 μg propidium iodide. The fluorescence of the stained cells was analyzed using a FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Data were analyzed with ModFit LT 2 (Becton Dickinson).

## RESULTS

### Analysis of the Characteristics of MA5 and B-B4 Antibodies

Flow cytometry was used to analyze the uptake of labeled antibodies on normal plasma cells and myeloma cells of patients and on myeloma cell lines (Table 1A). MA5 antibody recognized 43% (3 of 7) of normal plasma cells; 56% (17 of 30) of myeloma cells from patients with multiple myeloma or monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and 100% of the cell lines studied, including U266. Scatchard tests showed that the affinity of MA5 or

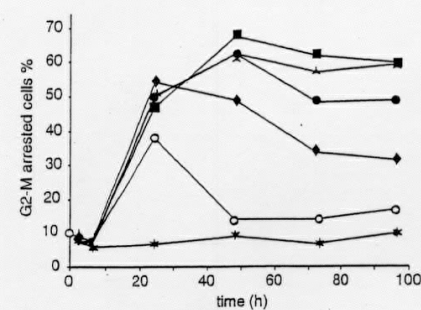


FIGURE 1. Cells arrested in G<sub>2</sub>/M phase (%) after exposure to B-B4-CITC-DTPAbismuth-213 at a specific activity of 400 MBq/mg for different concentrations: 10 nM (squares), 5 nM (arrowheads), 2 nM (black circles), 1 nM (diamonds), 0.5 nM (white circles), and unlabeled B-B4 (asterisks).

U266 cells was 9 nM (moderate affinity). The characteristics of B-B4 antibody had been determined previously. No cellular internalization of this antibody was found by the method described by Preijers et al.<sup>17</sup>

#### Tissue Uptake of B-B4 and MA5

Immunohistochemical analysis of fresh tissue sections revealed membrane uptake of B-B4 on renal urothelial cells, hepatocytes, biliary epithelium, lungs (alveoli, bronchi, and bronchial glands), and duodenal glands (Table 1B). Cytoplasmic labeling was observed on renal tubules and myocardial fibers. MA5 immunolabeling showed renal membrane uptake on tubes and urothelial cells. MA5 labeled the biliary epithelium, and uptake was also noted in the lung (alveoli, bronchi, and bronchial glands). Weak cytoplasmic labeling was observed in the smooth muscles of renal vessels and in myocardial fibers.

#### B-B4 Antibody Radiolabeled with Alpha-Emitters Caused Blockage of Myeloma Cells in G<sub>2</sub>/M Phase

The effects of B-B4 antibody labeled with <sup>213</sup>Bi at a specific activity of 400 MBq/mg were observed on the U266 line (Fig. 1). Cells were blocked in G<sub>2</sub>/M phase within 24 hours after the antibody was introduced into the medium. This blockage remained stable or increased slightly after 48 hours until the end of analysis (96 hours). The degree of blockage depended on the antibody concentration (67% of cells for 10 nM vs. 54% for 1 nM). For a concentration of 0.5 nM, the initial rise at 24 hours seemed to disappear after 48 hours. This increase in the proportion of cells blocked in G<sub>2</sub>/M phase was also observed for uptake of a non-

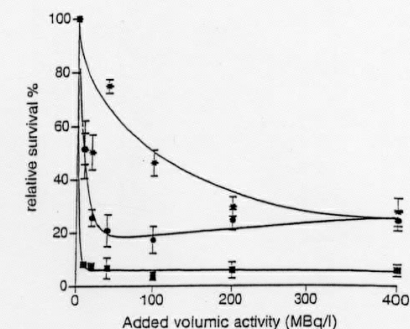


FIGURE 2. Relative survival at 24 hours (thymidine incorporation assay) after exposure to different bismuth 213-labeled monoclonal antibodies: B-B4 (squares), MA5 (circles), and irrelevant monoclonal antibodies (asterisks).

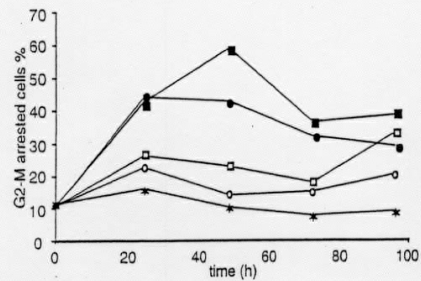
specific antibody labeled with the same radionuclide (data not shown).

#### G<sub>2</sub>/M Blockage Was Related to Myeloma Cell Mortality

The number of cells blocked in G<sub>2</sub>/M phase was considered in terms of the different parameters of cell survival. For each antibody concentration studied, the percentage of cells blocked in G<sub>2</sub>/M phase at 72 hours was related to cell survival, as measured by tritiated thymidine incorporation, MTT metabolism, and the limit dilution test (cell mortality was expressed by a semilogarithmic coordinate). A positive correlation was found between the percentage of cells blocked in G<sub>2</sub>/M phase and cell survival as measured by thymidine incorporation (R<sup>2</sup> = 0.92), MTT metabolism (R<sup>2</sup> = 0.94), and clonogenic survival (R<sup>2</sup> = 0.98).

#### Comparison of B-B4 and MA-5 at the Same Specific Activity

Our group previously determined that the optimal conditions for the use of B-B4 antibody are a concentration of 1–5 nM at a specific activity of less than 400 MBq/mg or at added volumic activities of 4–20 MBq/L to ensure that the effect is relatively specific. For a specific activity of 240 MBq/mg, cell survival was determined by tritiated thymidine incorporation 48 hours after incubation with B-B4-<sup>213</sup>Bi, MA5-<sup>213</sup>Bi, and a <sup>213</sup>Bi-labeled nonspecific antibody (Fig. 2). Marked inhibition of cell growth (about 25.7% of surviving cells) was observed for an added volumic activity of 40 MBq/L, and inhibition remained relatively constant (17.4–34.2%) for higher activities up to 400 MBq/L. For the same added activities, cell survival was signifi-

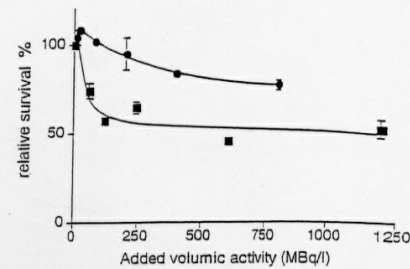


**FIGURE 3.** Cells arrested in G<sub>2</sub>/M phase (%) after exposure to different bismuth-213 (<sup>213</sup>Bi)-labeled monoclonal antibodies at different volumic activities: B-4-<sup>213</sup>Bi at 200 MBq/L (black squares), B-4-<sup>213</sup>Bi at 40 MBq/L (black circles), MA5-<sup>213</sup>Bi at 200 MBq/L (white squares), MA5-<sup>213</sup>Bi at 40 MBq/L (white circles), and unlabeled irrelevant monoclonal antibodies (asterisks).

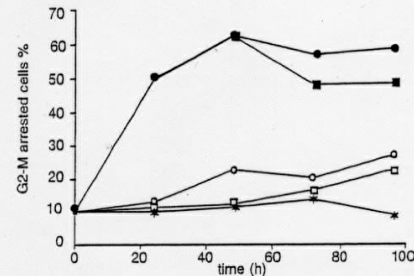
cantly lower (3.7–8.2%) with B-4 than with MA5. Cell proliferation was also reduced after nonspecific irradiation, showing a reduction of 46.2–74.8% for low and up to 27.8% for high added activities. Blockage in G<sub>2</sub>/M phase was then determined for the same antibodies at a specific activity of 240 MBq/mg (Fig. 3). For B-4, blockage occurred early (after 24 hours) and remained stable at a high level (29.1–44.2%). Blockage occurred later for MA5 (after 72 hours) and at a lower level (18–33.2%). Blockage related to nonspecific irradiation remained stable (7.7–16.2%).

#### Effects of Beta Radioimmunotherapy

MTT metabolization studies were performed on U266 cells to compare the effects of <sup>131</sup>I and <sup>213</sup>Bi labeling of B-4 antibody (Fig. 4). Reduction of cell viability was very slight (less than 6% mortality) for low specific activities of <sup>131</sup>I and about 16% for high activities. However, <sup>213</sup>Bi-B-4 showed a more marked effect on cell viability for both low and high added activities (28–43% and 47–54%, respectively). Cell cycle analyses were then conducted to determine the percentage of cells blocked in G<sub>2</sub>/M phase with <sup>131</sup>I and <sup>213</sup>Bi. After incubation with <sup>131</sup>I-labeled antibody, blockage after 72 hours was moderate (17–23%) for low added activities (Fig. 5) and more marked (20–27%) for 800 MBq/L. The same antibody, when labeled with <sup>213</sup>Bi, produced earlier and higher blockage (48–62%) both for low and high added activities. Only 9–13% of non-irradiated cells were in G<sub>2</sub>/M phase. Finally, cell survival curves were determined by a limit dilution technique (Fig. 6). For <sup>131</sup>I-labeled B-4 antibody, mortality was 43.1–55.5% for high added activities. For



**FIGURE 4.** Relative survival at 24 hours (MTT test) after exposure to B-4 labeled with different radionuclides: bismuth-213-labeled B-4 (squares), iodine-131-labeled B-4 (circles).



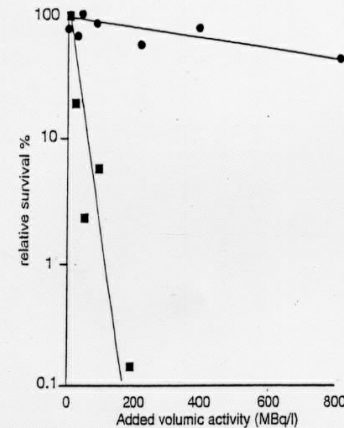
**FIGURE 5.** Cells arrested in G<sub>2</sub>/M phase (%) after exposure to B-4 labeled with different radionuclides at different volumic activities: B-4-<sup>213</sup>Bi at 600 MBq/L (black squares), B-4-<sup>213</sup>Bi at 240 MBq/L (black circles), B-4-<sup>131</sup>I at 800 MBq/L (white squares), B-4-<sup>131</sup>I at 200 MBq/L (white circles), and unlabeled irrelevant monoclonal antibodies (asterisks).

the same antibody labeled with <sup>213</sup>Bi, more than 99.99% of irradiated cells were destroyed when comparable added activities were used.

#### DISCUSSION

##### Comparison of B-4 and MA5 Antibodies

B-4 antibody showed better affinity (0.9 nM) than MA5 antibody (9 nM) on multiple myeloma cell lines. B-4 recognized 100% of cells of patients with multiple myeloma, whereas MA5 recognized only 56%. Thymidine analysis indicated that cell mortality was greater with <sup>213</sup>Bi-B-4 than with <sup>213</sup>Bi-MA5 (3.7–8.2% of survival vs. 17.4–34.2%). Moreover, a large part of the effect observed for MA5 was apparently related to nonspecific irradiation, since cell survival at high added activities was comparable to that for nonspe-



**FIGURE 6.** Clonogenic survival after exposure to B-4 labeled with different radionuclides: bismuth-213-labeled B-4 (squares), iodine-131-labeled B-4 (circles).

cific antibody. Moreover, there was a greater accumulation of cells in G<sub>2</sub>/M phase for B-4 (29.1–44.2%) than MA5 (18–33.2%). Thus, MA5 seems less capable than B-4 of targeting and destroying multiple myeloma cells. B-4 does not bind to soluble syndecan 1, whereas a part of MA5 may bind to soluble MUC1,<sup>10</sup> which could distort results for affinity and cell mortality. However, MA5 expression may be induced by dexamethasone,<sup>11</sup> which would presumably provide better efficacy for an association with corticosteroids.

Immunohistochemical studies showed B-4 uptake on lung parenchyma, intestinal epithelium, kidney, and heart. These potentially toxic effects need to be carefully watched for during the clinical development of RIT of myeloma. Various technical parameters related to the denaturation-renaturation conditions of fixed cells can cause false-positive labeling due to cryptic antigens. As B-4 is not internalized, the cytosolic uptake observed intensely in the heart and weakly in renal epithelium has no clinical implications. However, potential toxicity cannot be studied in the mouse, as there is no multiple myeloma tumor model for this species, but only subcutaneous tumor models that are not representative of the clinical occurrence of multiple myeloma. Only imaging data can indicate whether the biodistribution of radiolabeled antibody confirms the experimental results of immunohistochemistry. If toxicity (notably in the liver) proves to be a limiting factor for B-4 efficacy, MA5

may be an interesting alternative; it appears to be less toxic to the liver and duodenum. Moreover, an association of these two radiolabeled antibodies could allow the tissue toxicity of B-4 to be reduced. Many other malignancies express Muc-1; thus, it may be better suited to some other histologic types of cancer.

#### Comparison of Iodine 131 and Bismuth 213

<sup>213</sup>Bi-B-4 showed markedly greater efficacy than <sup>131</sup>I-B-4 for cell viability (MTT test, Fig. 5A), blockage in G<sub>2</sub>/M phase (Fig. 5B), and clonogenic survival (Fig. 5C). Thus, <sup>213</sup>Bi, an alpha-emitter, seems more suitable than <sup>131</sup>I for antibody labeling in RIT of myeloma. The modest effect of <sup>131</sup>I RIT could not have been due to deiodination of the antibody, since no internalization of B-4 was detected. Ninety-five percent of the disintegration of the <sup>131</sup>I bound to the antibody occurs within a radius of 1000  $\mu$ m.<sup>18</sup> If myeloma cells are at a distance of 100  $\mu$ m and in a concentration of 5.10<sup>5</sup> cells per mL, this energy is delivered far from the tumor target. Thus, RIT is most suitable for tumors with 10<sup>5</sup> to 10<sup>7</sup> cells.<sup>19</sup> As the maximal range for <sup>213</sup>Bi is 80  $\mu$ m, energy is delivered close to the cell nucleus. Moreover, the linear energy transfer of alpha particles is around 100 keV/ $\mu$ m, but only 0.2 keV/ $\mu$ m for yttrium-90, the most energetic beta-emitter.<sup>20</sup> These results are consistent with those for RIT cell models in which a similar rate of survival was found for lymphoma lines treated with yttrium-90.<sup>21</sup> A microdosimetric study comparing alpha and beta particles would be necessary to calculate the dose delivered to the nucleus of each cell and relate it to cell survival. In vivo application of this cellular model should determine whether alpha-emitters are more effective than beta-emitters. In fact, the toxic effects of alpha particles on normal bone marrow cells may prevent the delivery of a tumoricidal dose. Moreover, beta particles are likely to be more destructive in the context of microcell clusters within bone marrow than to isolated cells in vitro.

The choice of radionuclide will be an important consideration in the clinical development of RIT for multiple myeloma. The fact that B-4 antibody is not internalized excludes the use of Auger electron-emitters, such as <sup>125</sup>I. Among beta-emitters, yttrium-90 particles are more energetic than those of other radioisotopes, such as <sup>131</sup>I. Thus, nonspecific effects may be increased by the delivery of energy at some distance from the target cell, in which case yttrium-90 might be less effective than <sup>131</sup>I. The proximity of a cyclotron is not necessary for the alpha-emitter <sup>213</sup>Bi, which can be produced by chemical generators. However, short physical half-life makes it less useful for clinical appli-

cations than other alpha-emitters, such as astatine-211 or actinium-225.

#### G<sub>2</sub>/M Phase Blockage

Alpha and beta RIT of multiple myeloma causes an accumulation (up to 67%) of U266 cells in G<sub>2</sub>/M phase. After radiation-induced DNA damage, many cells are blocked at the G<sub>1</sub>/S control point of the cell cycle.<sup>22</sup> This point seems to be closely controlled by p53 protein. In multiple myeloma, p53 protein seems to be mutated rather rarely in the early stages of the disease, showing mutation rates of less than 20%. In advanced stages, mutations of p53 protein alter its capacity to bind to DNA and control the cell cycle.<sup>23</sup> Inactivating point mutations of this protein occur in the U266 line<sup>24</sup> and prevent it from playing an inhibitory role at the G<sub>1</sub>/S control point. This absence of G<sub>1</sub>/S control explains why cells are blocked in G<sub>2</sub>/M phase, where p53 protein appears to have little influence. Thus, in vivo RIT would show different efficacy for early and advanced forms of multiple myeloma.

A relation exists between the dose delivered to cells and the interval before blockage occurs, as well as blockage amplitude. Higher added activities produce earlier and more marked blockage. Blockage is closely correlated with cell survival, as measured by the incorporation of tritiated thymidine, MTT metabolization, and clonogenic survival. The G<sub>2</sub>/M phase, which follows the S phase of DNA synthesis, is used by the cell to repair any replication errors that occurred during synthesis. The material required for mitosis is then developed before mitosis finally takes place. The period of prolonged blockage in G<sub>2</sub>/M phase could be used by the cell for more thorough repair of radiation damage experienced during S phase. However, the blockage period does not appear to be correlated with variations in radiosensitivity.<sup>25</sup> In fact, cells blocked in G<sub>2</sub>/M phase show markedly greater sensitivity than those synchronized in the other phases of the cycle.<sup>26</sup> Radioimmunotherapy of multiple myeloma causes intense, prolonged blockage, depending on the dose delivered to cells. Blockage maintains the cells in a more radiosensitive phase, which accounts for the greater cell destruction. Thus, Ning has shown that caffeine-induced inhibition of G<sub>2</sub>/M blockage reduces cell death after irradiation and that preincubation with nocodazole (which prolongs G<sub>2</sub>/M blockage) causes even greater cell death.<sup>27</sup>

#### Clinical Use of Radioimmunotherapy

Various studies have demonstrated the efficacy of beta RIT in non-Hodgkin lymphoma.<sup>28</sup> Alpha RIT is currently being studied for application to isolated tumor cells, such as acute myeloid leukemia cells.<sup>29</sup> Our re-

sults indicate that B-B4 antibody has better recognition and destructive efficacy for tumor cells than MA5 antibody. Moreover, B-B4 was more destructive when labeled with <sup>213</sup>Bi than with <sup>131</sup>I. This would seem to confirm our initial hypothesis that alpha particles are more capable than beta particles of destroying isolated tumor cells.

It would be useful to study associations of alpha RIT with agents such as melphalan or prednisone (still the reference treatment for patients older than 65 years)<sup>30</sup> or with other substances such as cyclophosphamide, anthracyclines, vincristine, or interferon- $\alpha$ -2b (which has provided better response rates but no definite improvement in survival).<sup>1</sup> The blockage observed in G<sub>2</sub>/M phase suggests that alpha RIT could be associated with chemotherapeutic agents that prolong the blockage of tumor cells, such as doxorubicin or paclitaxel (which also seems to have radiosensitizing properties).<sup>21</sup> In cases of marked hematologic toxicity with RIT, it would be advisable to study an association with effective but nonmyelotoxic agents, such as thalidomide.<sup>31</sup> Our ongoing studies will try to specify the possible roles of these drugs in RIT. Otherwise, the use of B-B4 antibody radiolabeled with myeloablative doses might be comparable to that of whole-body irradiation, but with much more selective destruction of myeloma cells and milder extramedullary toxicity for patients younger than 65 years. It has been demonstrated in these patients that more intense therapy involving whole-body irradiation, chemotherapy, and autograft of stem cells improves results.<sup>32</sup>

The results reported in this article are promising for alpha RIT with B-B4 antibody. The continued overexpression of syndecan-1 in progressive forms of multiple myeloma suggests that B-B4 labeled with alpha-emitters would be effective even in the treatment of refractory forms of the disease. On the basis of these encouraging results, a Phase I/II trial will soon be carried out to develop this therapeutic approach for clinical application.

#### REFERENCES

1. Bataille R, Harousseau JL. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 1997;336:1657-64.
2. Knox SJ, Meredith RF. Clinical radioimmunotherapy. *Semin Radiat Oncol* 2000;10:73-93.
3. McDevitt MR, Sgouros G, Finn RD, Humm JL, Jurcic JG, Larson SM, et al. Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur J Nucl Med* 1998; 25:1341-51.
4. Couturier O, Faivre-Chauvet A, Filippovich IV, Thedrez P, Sai-Maurel C, Bardies M, et al. Validation of <sup>213</sup>Bi-alpha radioimmunotherapy for multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 1999;5(10 Suppl):3165s-3170s.

5. Clement C, Vooyis WC, Klein B, Wijdenes J, B-B2 and B-B4, two new Moabs against secreting plasma cells. In: Schlossman S, editor. Proceedings of the fifth international workshop and conference on human leukocyte differentiation antigens, Boston; 1995:174.
6. Wijdenes J, Vooyis WC, Clement C, Post J, Morard F, Vita N, et al. A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol* 1996;94:318-23.
7. Vooyis WC, Post J, Wijdenes J, Schuurman HJ, Bolognesi A, Polito L, et al. Efficacy and toxicity of plasma-cell-reactive monoclonal antibodies B-B2 and B-B4 and their immunotoxins. *Cancer Immunol Immunother* 1996;42:319-28.
8. Dore JM, Morard F, Vita N, Wijdenes J. Identification and location on syndecan-1 core protein of the epitopes of B-B2 and B-B4 monoclonal antibodies. *FEBS Lett* 1998;426:67-70.
9. Burton J, Mishina D, Cardillo T, Lew K, Rubin A, Goldenberg DM, et al. Epithelial mucin-1 (MUC1) expression and MA5 anti-MUC1 monoclonal antibody targeting in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 1999;5(10 Suppl):3065s-3072s.
10. Treon SP, Maimonis P, Bua D, Bua D, Young G, Raje N, Mollic J, et al. Elevated soluble MUC1 levels and decreased anti-MUC1 antibody levels in patients with multiple myeloma. *Blood* 2000;96:3147-53.
11. Treon SP, Mollic JA, Urashima M, et al. Muc-1 core protein is expressed on multiple myeloma cells and is induced by dexamethasone. *Blood* 1999;93:1287-98.
12. Patton S, Gendler SJ, Spicer AP. The epithelial mucin, MUC1, of milk, mammary gland and other tissues. *Biochim Biophys Acta* 1995;1241:407-23.
13. Major PP, Dion AS, Williams CJ, Mattes MJ, Wang T, Rosenthal L. Breast tumor radioimmunodetection with a <sup>111</sup>In-labeled monoclonal antibody (MA5) against a mucin-like antigen. *Cancer Res* 1990;50(3 Suppl):927s-931s.
14. Brechbiel MW, Gansow OA, Atcher RW, et al. Synthesis of 1-(p-isothiocyanatobenzyl) Derivatives of DTPA and EDTA: antibody labeling and tumor imaging studies. *Inorg Chem* 1996;25:2772-81.
15. Kaspersen FM, Bos E, Doormalen AV, Geertlings MW, Apostolidis C, Molinet R. Cytotoxicity of 213Bi- and 225Ac-immunoconjugates. *Nucl Med Commun* 1995;16:468-76.
16. Salacinski PR, McLean C, Sykes JE, Clement JV, Lowry PJ. Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3 alpha,6 alpha-diphenyl glycoluril (Iodogen). *Anal Biochem* 1981;117:136-46.
17. Preijers FW, Tax WJ, De Witte T, Janssen A, vd Heijden H, Vidal H, et al. Relationship between internalization and cytotoxicity of ricin A-chain immunotoxins. *Br J Haematol* 1988;70:289-94.
18. Jungerman JA, Yu KH, Zanelli CI. Radiation absorbed dose estimates at the cellular level for some electron-emitting radionuclides for radioimmunotherapy. *Int J Appl Radiat Isot* 1984;35:883-8.
19. Wheldon TE, O'Donoghue JA, Barrett A, Michalowski AS. The curability of tumours of differing size by targeted radiotherapy using 131I or 90Y. *Radiother Oncol* 1991;21:91-9.
20. Humm JL. Dosimetric aspects of radiolabeled antibodies for tumor therapy. *J Nucl Med* 1986;27:1490-7.
21. O'Donnell RT, DeNardo SJ, Miers LA, Kukis DL, Mirick GR, Kroger LA, et al. Combined modality radioimmunotherapy with Taxol and 90Y-Lym-1 for Raji lymphoma xenografts. *Cancer Biother Radiopharm* 1998;13:351-61.
22. Little J. Delayed inhibition of DNA synthesis in irradiated human diploid cells. *Nature* 1968;218:1064-5.
23. Portier M, Moles JP, Mazars GR, Jeanteur P, Bataille R, Klein B, et al. p53 and RAS gene mutations in multiple myeloma. *Oncogene* 1992;7:2539-43.
24. Mazars GR, Portier M, Zhang XG, et al. Mutations of the p53 gene in human myeloma cell lines. *Oncogene* 1992; 7:1015-8. [Published erratum appears in *Oncogene* 1993;8: 1107.]
25. Nagasawa H, Keng P, Harley R, Dahlberg W, Little JB. Relationship between gamma-ray-induced G<sub>2</sub>/M delay and cellular radiosensitivity. *Int J Radiat Biol* 1994;66:373-9.
26. Skwarchuk MW, Wouters BG, Skarsgard LD. Substructure in the radiation survival response at low dose: asynchronous and partially synchronized V79-WNRE cells. *Int J Radiat Biol* 1993;64:601-12.
27. Ning S, Knox SJ. G<sub>2</sub>/M-phase arrest and death by apoptosis of HL60 cells irradiated with exponentially decreasing low-dose-rate gamma radiation. *Radiat Res* 1999;151:659-69.
28. Kaminski MS, Zasadny KR, Francis IR, Milik AW, Ross CW, Moon SD, et al. Radioimmunotherapy of B-cell lymphoma with 131I anti-B1 (anti-CD20) antibody. *N Engl J Med* 1993; 329:459-65.
29. Jurcic JG, Sgouros G, Ballangrud A, Ma D, Hamacher K, Geertlings MW, Humm JL, Brechbiel RM, Apostolidis C, Larson SM, Scheinberg DA. Phase I trial of targeted alpha-particle therapy for myeloid leukemias with bismuth-213-HuM195 (anti-CD33). American Society of Clinical Oncology, 1999;Abstract 22.
30. Alexanian R, Dimopoulos M. The treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med* 1994;330:484-9.
31. Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 1999; 341:1565-71. [Published erratum appears in *N Engl J Med* 2000;342:364.]
32. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N Engl J Med* 1996;335:91-7.

## **8.2 Article 2**

## Cancer radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides

Olivier Couturier<sup>1, 2</sup>, Stéphane Supiot<sup>1</sup>, Marie Degraef-Mougin<sup>1</sup>, Alain Faivre-Chauvet<sup>1</sup>, Thomas Carlier<sup>1</sup>, Jean-François Chatal<sup>1</sup>, François Davodeau<sup>1</sup>, Michel Chereh<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM U 601, quai Moncousu, Nantes, 44035, France

<sup>2</sup> Department of Nuclear Medicine, Place Alexis Ricordeau, Hôtel Dieu, 44093 Nantes, Cedex, France

Published online: 20 April 2005

© Springer-Verlag 2005

**Abstract.** In lymphoid malignancies and in certain solid cancers such as medullary thyroid carcinoma, somewhat success has been achieved when applying radioimmunotherapy (RIT) with  $\beta$ -emitters for the treatment of refractory cases. The development of novel RIT with  $\alpha$ -emitters has created new opportunities and theoretical advantages due to the high linear energy transfer (LET) and the short path length in biological tissue of  $\alpha$ -particles. These physical properties offer the prospect of achieving selective tumoural cell killing. Thus, RIT with  $\alpha$ -emitters appears particularly suited for the elimination of circulating single cells or cell clusters or for the treatment of micrometastases at an early stage. However, to avoid non-specific irradiation of healthy tissues, it is necessary to identify accessible tumoural targets easily and rapidly. For this purpose, a small number of  $\alpha$ -emitters have been investigated, among which only a few have been used for in vivo preclinical studies. Another problem is the availability and cost of these radionuclides; for instance, the low cost and the development of a reliable actinium-225/bismuth-213 generator were probably determining elements in the choice of bismuth-213 in the only human trial of RIT with an  $\alpha$ -emitter. This article reviews the literature concerning monoclonal antibodies radiolabelled with  $\alpha$ -emitters that have been developed for possible RIT in cancer patients. The principal radio-immunoconjugates are considered, starting with physical and chemical properties of  $\alpha$ -emitters, their mode of production, the possibilities and difficulties of labelling, in vitro studies and finally, when available, in vivo preclinical and clinical studies.

**Keywords:** Radioimmunotherapy – Radionuclides – Alpha particles

Eur J Nucl Med Mol Imaging (2005) 32:601–614  
DOI 10.1007/s00259-005-1803-2

Olivier Couturier (✉)

Department of Nuclear Medicine, Place Alexis Ricordeau, Hôtel Dieu, 44093 Nantes, Cedex, France  
e-mail: coutur@nantes.inserm.fr  
Tel.: +33-2-40084136, Fax: +33-2-40084218

## Introduction

Nuclear medicine provides efficient tools for the diagnosis and initial staging of malignancies, the detection of recurrence and therapy monitoring, the most notable example being positron emission tomography with fluorine-18 fluorodeoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ FDG). Nuclear medicine also offers tools for cancer therapy, including radioimmunotherapy (RIT) using an antibody radiolabelled typically with a beta-emitting radionuclide (e.g. iodine-131, yttrium-90 or rhenium-186 or -188). RIT with beta-particle emitters (RIT  $\beta$ ) has been proposed in cancers that do not respond to conventional therapies, in particular small solid tumours, but has proved more successful in haematological malignancies (lymphoma and leukaemia) [1–14]. RIT may directly deliver a radioactive source to the tumour tissue, depending on proper localisation of the radiolabelled antibody and on easy accessibility of the tumour, which is one of the major limitations of RIT.

More recently, a new RIT approach with alpha-particle emitters (RIT  $\alpha$ ) has been considered and has led to the development of chelating agents and preclinical studies. The effectiveness of RIT  $\alpha$  may be explained by the radiobiological properties of  $\alpha$ -particles, due to a high ionisation potential per unit path length. For an equivalent quantity of radio-immunoconjugate fixed on tumour cells, the cytotoxicity of  $\alpha$ -particles is 5–100 times that of  $\beta$ -particles:  $\alpha$ -particles have a mean path length of 50–100  $\mu\text{m}$  in biological tissue and a linear energy transfer (LET) of >20 to several hundreds of kiloelectronvolts per micrometre, resulting in a higher absorbed dose and a larger number of ionisations in a range corresponding to cell diameter (Fig. 1). The result is cell-specific targeting with a high probability of non-repairable DNA double-stranded breaks, because the distance between two strands of DNA is almost the same as the distance between two ionisations of  $\alpha$ -particles. Thus, the cytotoxicity of  $\alpha$ -particles may be extremely effective and less dose dependent than that of  $\beta$ -particles, and cell death may occur after a single or a few  $\alpha$ -particle emissions [15, 16].

Another point to be considered when the two forms of RIT are compared is the dosimetry. In addition to the path length, the LET and the relative biological effectiveness

602

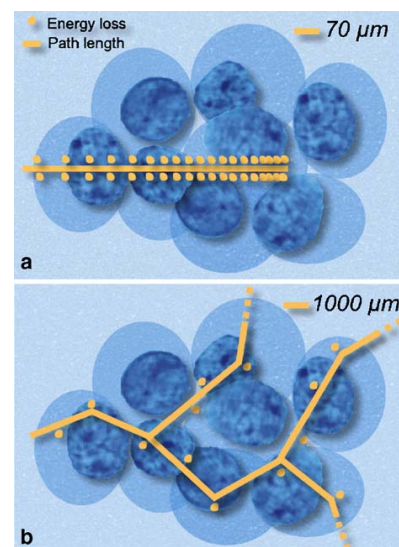


Fig. 1. a Short path length of  $\alpha$ -particles, in the range of a few cell diameters, compared with b the longer path length of  $\beta$ -particles

(RBE), the short range of  $\alpha$ -particles and the low absorbed dose (only a few  $\alpha$ -particles hit a cell) distinguish the dosimetry of  $\alpha$ -particles from the conventional dosimetry with  $\beta$ -particles. The variation of  $\alpha$ -particle energy loss in matter is stochastic, necessitating the use of specific microdosimetric methods [17, 18] such as Monte Carlo calculation [19, 20] or analytical methods [21]. These methods make it possible to calculate probability densities of specific energy (energy deposited in the targeted cellular volume and more often the cell nucleus), equivalent to the absorbed dose. The Monte Carlo method has also been used to simulate spheroids of cells and to calculate radiobiological effects after  $\alpha$  irradiation from decay of astatine-211 and actinium-225 [22, 23]. Finally, dosimetry and pharmacokinetics of the daughter products must be considered, and if these daughters remain within the neighbourhood of the parent, energies associated with their emissions must also be included in the dosimetric calculation [24–26].

However, the high cytotoxicity of  $\alpha$ -particles could be a disadvantage with respect to the irradiation of normal tissues. In order to avoid non-specific and undesirable irradiation of healthy normal tissue, it is necessary to possess (1) a monoclonal antibody (MAb) with a high tumour affinity and specificity, and (2) a radio-immunoconjugate (RIC) construct with high stability, which will avoid release of the radionuclide as free element. On the other hand, the high cell-specific effectiveness of RIT  $\alpha$  requires a biological model with high tumour antigen homogeneity.

Indeed, because of the short path length of  $\alpha$ -particles in biological tissue, several tumour cells cannot be ionised by the same  $\alpha$ -particle. High homogeneity of antigenic expression is thus required for the complete destruction of micrometastases. Conversely, with radiations of low LET with a longer path length, the cross-fire of  $\beta$ -particles may make up for the non-homogeneity of antigen expression. Finally, the percentage of RICs fixed by tumoural cells could also limit the effectiveness of both RIT  $\alpha$  and RIT  $\beta$ . This percentage of fixed RICs is all the larger when the size of the tumour is small [27]. This provides a further argument in favour of using RIT in tumours that are small and readily accessible to RICs injected by the systemic or endocavitary route.

This article is a review of the literature concerning  $\alpha$ -emitters used for RIT  $\alpha$  of cancer. Despite constant efforts over almost two decades, published data remain limited to primarily three  $\alpha$ -emitters in animal studies (astatine-211, bismuth-212 and bismuth-213) and to only one  $\alpha$ -emitter in a human study (bismuth-213).

Radioimmunotherapeutic agents for RIT  $\alpha$ 

Alpha particles are helium-4 nuclei, which are monoenergetic but of high energy with a high LET [28]. There are approximately 100  $\alpha$ -emitting radionuclides (essentially heavy isotopes with an atomic number  $\geq 82$ ), but only a small number are available for clinical use [29]. The majority of these  $\alpha$ -emitting radionuclides are produced in nuclear reactors; only a few are cyclotron products. In the case of radionuclides of a short physical half-life (such as bismuth-213), the duration of elution and of compound purification must be short enough to obtain a radiopharmaceutical of good radiochemical quality and purity. The selection of  $\alpha$ -emitting radionuclides also has to take into account daughter products which could be metabolised in a different way to the parent. This is all the more important if the daughter nuclide has a long physical half-life. Finally, the fate of the radionuclide after cell targeting by RICs may influence the choice of  $\alpha$ -emitter; for instance, it has been shown that astatine is released more rapidly from cells than is bismuth [30].

RIT  $\alpha$  with conjugates of astatine-211*Physicochemical properties of astatine-211*

Astatine-211 is the heaviest radiohalogen without a stable isotope. It is one of the most promising  $\alpha$ -emitters for medical applications, its potential utility for radiotherapy having been recognised 30 years ago [31]. It decays (half-life 7.2 h) via a branched pathway (Fig. 2). The first route of disintegration is by  $\alpha$ -emission to bismuth-207 (42%), followed by electron capture to stable lead-207. The second is by electron capture and leads to polonium-211 (58%), followed by  $\alpha$ -emission to stable lead-207 [32, 33]. The  $\alpha$ -emitter astatine-211 has several favourable physical proper-

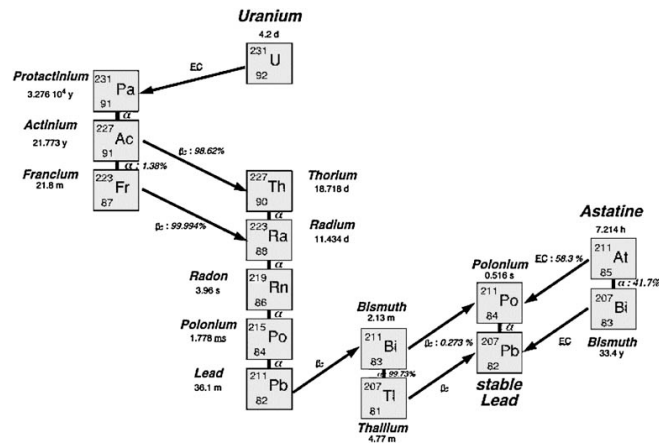


Fig. 2. Decay of uranium-231 and astatine-211. Astatine-211 decays with a half-life of 7.2 h to stable lead-207. The first route of disintegration is by direct  $\alpha$ -emission to bismuth-207 (42%), followed by electron capture to lead-207. The second is by electron capture to polonium-211 (58%), followed by  $\alpha$ -emission to lead-207

ties for RIT. The  $\alpha$ -particles have an energy of 5.87 (42%) and 7.45 (58%) MeV, and a range in biological soft tissue of only 55–80  $\mu\text{m}$ , i.e. a few cell diameters. They also have a high mean LET value of about 100  $\text{keV}/\mu\text{m}$ , close to the optimum value for a high RBE at which lethal damage is maximised [34]. The polonium-211 daughter emits X-rays of 77–92 keV, sufficient photon energy for imaging [35]. With regard to radiation protection, more than 99% of the radiation energy of astatine-211 comes from  $\alpha$ -particles [36].

#### Production of astatine-211

Astatine-211 is generally produced by bombardment with  $\alpha$ -particles on a natural bismuth target in a cyclotron (reaction  $^{209}\text{Bi}(\alpha, 2n)^{211}\text{At}$ ) [37]. This reaction is followed by a dry distillation of the target matrix and by the collection of astatine-211 into a chloroform solution [38, 39]. The energy of the  $\alpha$ -particle beam accelerated in the cyclotron must be well controlled to minimise the production of astatine-210 (half-life of 8.1 h), which decays by  $\alpha$ -emission to polonium-210 (half-life of 138 days). The bone seeking of polonium-210 could be responsible for unacceptable toxicity, and variability in the radiochemical purity of astatine-211 produced by a cyclotron delayed clinical trials for an extended period. More recently, the group of Zalutsky has published an improvement in the production of astatine-211, also from the reaction  $^{209}\text{Bi}(\alpha, 2n)^{211}\text{At}$ , using an internal target system and purification by a dry distillation process. This method makes it possible to produce higher

activities of astatine-211 (mean production yield 27.75  $\pm$  2.59  $\text{MBq}/\mu\text{A h}$ ) [33].

#### Antibody labelling

The half-life of astatine-211 is relatively long compared with that of other radionuclides available for RIT  $\alpha$ ; this offers greater flexibility for the chemistry of complexation and enables the study of slower biological processes. These considerations have motivated the development of numerous approaches to selectively deliver astatine-211 to tumours, with the use of colloids [40], pharmaceutical molecules [41, 42], melanin precursors [43], substrate carriers [44], thymidine analogues [45], biotin analogues [46] and biphosphonate complexes [36, 47, 48]. Astatine-211 has also been conjugated to MAbs, such as the anti-CD20 rituximab, or to antibody fragments [39, 49–52]. With a number of these compounds, it has been demonstrated that it is possible to kill cells selectively with only one to five  $\alpha$ -particles [53–55]. Using a bifunctional chelating agent (*N*-succinimidyl-3-(trimethylstannyl)-benzoate), Zalutsky et al.'s group [38, 39] has developed a two-step method for radiolabelling intact human/mouse chimeric MAb 81C6 (which reacts with an epitope of the extracellular matrix glycoprotein tenascin of glioma and other tumours) and fragments F(ab')<sub>2</sub> of human/mouse chimeric MAb Mel-14 (reactive with chondroitin sulphate proteoglycans of human glioma and melanoma). The whole procedure lasts 1.5 h, an acceptable time given the half-life of 7.2 h and the specific activity of 148  $\text{MBq}/\text{mg}$  [34, 56].

#### Preclinical in vitro and animal studies

The in vitro cytotoxicity of  $^{211}\text{At}$ -Mab 81C6 and  $^{211}\text{At}$ -F(ab')<sub>2</sub>-Mel-14 was investigated in monolayers of D-247 MG human glioma cells and of SK-MEL-28 human melanoma cells. For both cell lines, the reduction in survival to 0.37 required an average of only one to two  $\alpha$ -particle hits to the cell nucleus [54]. In another study with the same  $^{211}\text{At}$ -Mab 81C6 in D-247 MG human glioma spheroids with a radius of 100  $\mu\text{m}$  greater than the range of astatine-211  $\alpha$ -particles, no increase in cytotoxicity was seen in hyperthermia-pretreated spheroids compared with the normothermic controls [57].

Animal studies were carried out with whole antibodies or fragments of antibody radiolabelled with astatine-211 and injected into mice by the systemic route (T cell lymphoma [58], xenografts of human melanoma or glioma [34, 39]) or by the intracavitary route (meningitis or ovarian tumours). Single intrathecal injections significantly extended the survival times of athymic rats with human rhabdomyosarcoma meningitis, and sometimes helped obtain complete remission [59]. In another model of intracavitary injection, the radiobiological efficiency of MAb Mov18 radiolabelled with astatine-211 or iodine-131 was estimated in mice bearing human ovarian cancer (OVCAR-3) [60]. No microscopic or macroscopic lesion was reported in nine of ten mice injected with  $^{211}\text{At}$ -RIC (310–400 kBq) or in three of ten mice injected with  $^{131}\text{I}$ -RIC (5.1–6.2 MBq). Doses received by the bone marrow were almost equivalent with astatine-211 and iodine-131, at 2.4–3.1 Sv and 3.4–4.1 Sv respectively. As a result, for an equivalent irradiation of the bone marrow, RIT  $\alpha$  seemed more effective, with a suitable specificity of the tumour targeting.

#### Human studies

Zalutsky's group has reported the first human study with astatine-211, with injected quantities of radiolabelled antibody from 74 to 370 MBq. To date, however, these data have still not featured in any publication, with the exception of a phase I trial with the same antibody radiolabelled with iodine-131 (42 patients with glioma) [61].

#### RIT $\alpha$ with conjugates of bismuth-212

##### Physicochemical properties of bismuth-212

Bismuth-212 is a radiometal. It decays (half-life 60.55 min) through either thallium-208 (36%) or polonium-212 (64%) to stable lead-208 (Fig. 3). Both routes of decay are by  $\alpha$ -particle emission (average energy of 7.8 MeV and path length in biological tissues from 40 to 100  $\mu\text{m}$ ) and  $\beta$ -emission. Thallium-208, produced in the decay chain of bismuth-212, emits a very high energy  $\gamma$ -ray of 2.6 MeV, requiring heavy shielding to minimise the exposure of the staff. In addition, radon-220 is produced and this requires a radio-protected and ventilated enclosure.

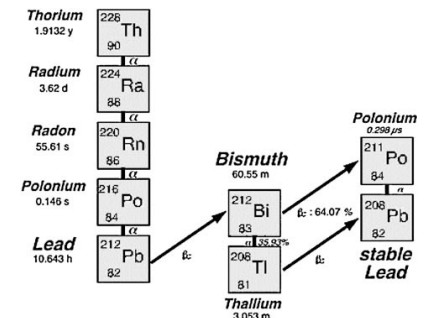


Fig. 3. Decay of thorium-228. Lead-212 decays by  $\beta$ -emission with a half-life of 10.6 h to bismuth-212. Bismuth-212 decays with a half-life of 61 min to stable lead-208. The first route of disintegration is by direct  $\alpha$ -emission to thallium-208, then by beta emission to lead-208. The second is by  $\beta$ -emission to polonium-211, then by  $\alpha$ -emission to lead-208

#### Production of bismuth-212

Bismuth-212 may be obtained from the decay chain of thorium-228 (Fig. 3). However, the short physical half-life of bismuth-212 may be a problem in terms of the time required for RIC radiolabelling processes and the duration of access to the tumour. This problem was partially offset by the construction of generators of radium-224 (half-life 3.6 days) for the production of bismuth-212 [62].

#### Antibody labelling

Kozak et al. [63] were the first to demonstrate that bismuth-212 can be bound to MAb [anti-TAC directed to human interleukin 2 (IL-2) receptor] conjugated by a bifunctional metal ligand, the isobutylcarboxylic anhydride of diethylene triamine penta-acetic acid (DTPA). All the other chelating agents developed later to bind bismuth-212 and were derived from DTPA [64, 65].

All the initially developed molecules [DTPA anhydride, cyclic DTPA anhydride (cDTPA), 2-(*p*-isothiocyanato benzyl)-DTPA (SCNBzDTPA), isothiocyanatobenzyl (*trans*-cyclohexyl DTPA (CHX-A-DTPA) and 2-(isothiocyanatobenzyl)-6-methyl-DTPA (MxDTPA)] showed instability in vivo after systemic injection, limiting the use of the RICs to endocavitary injections, e.g. in the lymphatic system or the peritoneal cavity [66, 67]. New chelates were therefore developed, which significantly enhanced the stability of the RICs in vivo: 1,4,7,10-tetra-azacyclododecane-*N,N',N'',N'''*-tetra-acetic acid (DOTA) [67] and 11-tetra-azacyclotetradecane-*N,N',N'',N'''*-tetra-acetic acid [68]. DOTA was also used as a bifunctional chelating agent and the stability of  $^{212}\text{Bi}$ -RICs has been demonstrated in an animal model of erythroid leukaemia [67] as well as in another leukaemia model [68].



### Preclinical *in vitro* and animal studies

*In vitro*, Macklis et al. have reported a high effectiveness of  $^{212}\text{Bi}$ -anti-Thy 1.2 RIC (reactive with the Thy 1.2 antigen expressed on the surface of normal and malignant murine T cells) compared with a non-specific  $^{212}\text{Bi}$ -RIC with a model of EL-4 murine lymphoma cells [69]. In this study, approximately three  $^{212}\text{Bi}$ -RICs fixed by tumoural cells reduced the tumoural proliferation as assessed by a tritiated thymidine incorporation test. *In vivo*, RIT  $\alpha$  with the same  $^{212}\text{Bi}$ -anti-Thy 1.2 RIC has been proposed in a model of tumoural ascites in mice [69, 70].  $^{212}\text{Bi}$ -anti-Thy 1.2 and tumoural cells (cellular line Thy 1.2+EL-4) were injected by the intraperitoneal route (i.p.), allowing immediate access of the RICs to the tumoural cells. Injections of activities up to 15 MBq did not result in secondary toxic effects. Irrelevant or cold IgM was ineffective whereas activities from 5.5 to 15 MBq of  $^{212}\text{Bi}$ -anti-Thy 1.2 prolonged the survival times to more than 30 days. Half of the animals were still alive 2 months after the administration of  $^{212}\text{Bi}$ -anti-Thy 1.2. Apoptotic phenomena were involved in the cellular death, and microdosimetric calculations showed that one to four  $\alpha$ -particles crossing the cell nucleus reduced the cellular population by 90% [65]. Another model of lymphoma was assessed in mice bearing a murine lymphoma transfected with the human antigen CD25 (SP2/Tac cells) expressing an  $\alpha$ -receptor for interleukin-2 (IL-2R $\alpha$ ). The  $^{212}\text{Bi}$ -RIC was a humanised MAb anti-Tac radiolabelled with bismuth-212 via the bifunctional CHX-ADTPA. The i.p. or intravenously (i.v.) injected  $^{212}\text{Bi}$ -RICs, with activities from 5.5 to 7.4 MBq, made it possible to prolong the survival time of animals and to prevent relapses in, respectively, 75% and 30% of the cases. However, the i.v. injection of  $^{212}\text{Bi}$ -RIC did not decrease the volume of the large tumoural masses, even with activities higher than 7.4 MBq [71]. A final haematological murine model widely studied for RIT is the erythroid leukaemia of Rauscher, in which a leukaemia is generated in the spleen or in other organs [72]. Specific and fast RIC uptake by tumoural cells was reported after i.v. systemic injection of MAb radiolabelled with iodine-125 or -131 [73], with indium-111 [73], with bismuth-206 (electronic capture decay) via different bifunctional chelating agents [67]) or with bismuth-212 via DTPA. Intraperitoneal injection of  $^{212}\text{Bi}$ -RICs has made it possible to reduce the volume of tumours and to double the survival times of animals [66].

In a murine model of human colon carcinoma (LS174T), a study was performed to compare the administration of a single i.p. dose versus multiple daily doses of  $^{212}\text{Bi}$ -B72.3 (immunoglobulin directed to a surface antigen, TAG-72). Activities of up to 7 MBq were administered i.p. over a 3-day period with acceptable toxicity. Significant antitumoural effects were obtained, resulting in an improvement in the survival times [74]. A murine model of i.p. metastases of ovarian carcinoma was used by Rotmensch et al. A preliminary study on biopsy samples had shown that the calculation of the dose distribution depended (1) on the physical properties of the  $\alpha$ -emitter, (2) on the energy absorption and (3) on the size of the tumoural volume to be

treated [75]. A second study has shown that  $\alpha$ -particles do not need to be internalised in order to have radiobiological effects [76]. In the most recent study, the authors studied the radiobiological efficiency of  $\alpha$ -particles of bismuth-212 in a murine microscopic ovarian carcinoma model (cells of Ehrlich). Bismuth-212, which was not linked to any molecule vector, was distributed in a uniform way after i.p. administration and made it possible to obtain a remission rate of up to 40% without any toxic side-effects [77]. In mice bearing a human ovarian tumour (SK-OV-3), Horak et al. proposed a nanogenerator approach, i.e.  $^{212}\text{Pb}$ -RIC (MAb AE1 anti-HER2/neu) radiolabelled via bifunctional *p*-SCN-Bz-DOTA. In this approach, bismuth-212, a daughter nuclide of lead-212, was the source of  $\alpha$ - and  $\beta$ -emission [78]. The toxicity and radiobiological efficiency of lead-212 RIC were estimated in models of solid tumours and of ascites of this ovarian carcinoma, after i.v. and i.p. injections respectively. After i.v. administration, myelosuppression was observed at doses higher than 925 kBq while no toxic effect was observed after i.p. administration. Prolongation of survival was obtained after i.p. injection, while i.v. injection permitted only a modest delay in the progression of small-volume tumoural masses only (15 mm<sup>3</sup>).

### Human studies

There have been no human studies to date.

### RIT $\alpha$ with conjugates of actinium-225

#### Physicochemical properties of actinium-225

Actinium-225 is a radiometal (half-life 10 days) with six daughters produced in the decay chain up to stable bismuth-209 (Fig. 4). For every decay of actinium-225, there are successively five  $\alpha$ -emissions and three  $\beta$ -emissions, most of them of high energy [major radiations of 8.38 MeV ( $\alpha$ ) and 1.42 MeV ( $\beta$ )] [79]. However, actinium-225 shares two advantages with radium-223 in that (1) it does not emit high-energy  $\gamma$ -rays, thus facilitating transport, and (2) it has a relatively long half-life of about 10 days, allowing road transport to a distant nuclear medicine department, as well as the study of slow biological processes.

#### Production of actinium-225

Actinium-225 can be obtained in several ways. Neutron irradiation of thorium-232 leads to uranium-233, which was produced in kilogram amounts in the 1960s, and then gram quantities of thorium-229. With a half-life of 7,340 years, thorium-229 can be considered an eternal source of actinium-225. By multiple neutron capture in radium-226, depending on neutron flux, hardness and dose, a mixture of actinium-227, thorium-228 and thorium-229 can be obtained. Compared with the first production mode (by

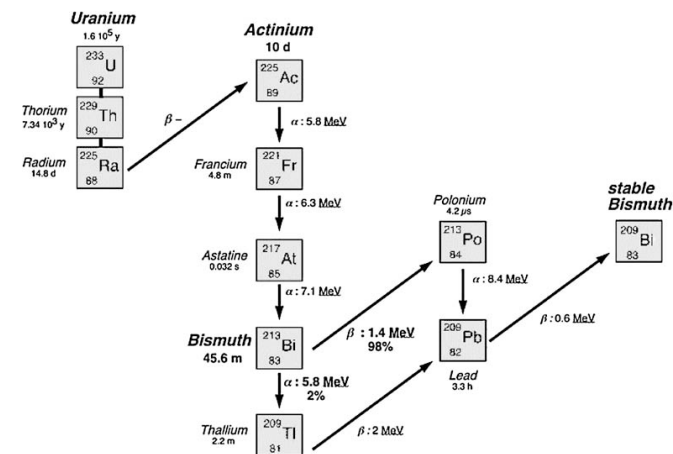


Fig. 4. Decay of actinium-225 and bismuth-213. Actinium-225, francium-221 and astatine-217 are heavy radionuclides which decay by  $\alpha$  disintegrations to bismuth-213. Bismuth-213 decays by  $\alpha$ - and  $\beta$ -emissions to bismuth-209, the stable element. Approximately 90% of the energy deposited in a biological medium is by alpha particles

neutron capture of thorium-232), thorium-229 is directly obtained with a higher yield and actinium-225 can be isolated only under heavier  $\gamma$  shielding due to the enhanced thallium-208 formation. The separation of the nuclides was achieved on a titanium phosphate column which was also used for the construction of an actinium-225 generator [80]. Let us also note that this reaction is ideal for actinium-227 production, which is a source of radium-223. A third means of production is a proton-induced reaction in radium-226, which leads to actinium-225 directly via a (p,2n) reaction. However, this cheaper and fast process requires repeated irradiation of radium-226 to obtain from 1 mg of radium-226 about a few hundred megabecquerels of actinium-225. After production, actinium-225 has to be purified on a Dowex-50 column before being used for antibody radiolabelling or linked to a resin for the production of bismuth-213 with an actinium-225/bismuth-213 generator [81].

### Antibody labelling

The use of actinium-225 for RIT  $\alpha$  is limited by the availability of a chelating agent able to stably bind this radionuclide as well as its daughters [82]. Furthermore, the chelating agent must be able to withstand the recoil energy of  $\alpha$ -particles (100–200 keV, higher than the binding energy). New perspectives have materialised with the recent synthesis of a new chelating agent, 2-(4-isothiocyanatobenzyl)-1,4,7,1,13,16-hexa-azacyclohexa-decane-1,4,7,10,13,16-hexa-acetic acid (HEHA-NCS), which made it possible to successfully radiolabel three antibodies (CC49, T101, BL-3) with actinium-225 [83]. Another application

of actinium-225 could be that of the bismuth-213 parent, by using an *in vivo* generator. This nanogenerator has been developed by the group from the Memorial Sloan–Kettering Cancer Center, who used a bifunctional chelate (1,4,7,10-tetra-azacyclododecane-tetra-acetic acid or DOTA) [84] for the complexation of actinium-225 in a stable way.

### Preclinical *in vitro* and animal studies

Two recent animal studies with actinium-225 were carried out by Kennel et al. (1) on a murine model of lung metastases of mammary cancer EMT-6 already used by the same group with bismuth-213 [85] and (2) on a murine model of ovarian carcinoma LS174T [86], by using the same chelating agent HEHA for the radiolabelling of MAb 201B and MAb Hu-delta CH2 CC49, specific for each model respectively. In the first model of lung metastases, the  $^{225}\text{Ac}$ -RIC accumulated considerably in the lungs before slow elimination of free actinium-225 by the liver. Its daughters and bismuth-213 were eliminated as free elements into urine. The release of actinium-225 and bismuth-213 was responsible for toxicity to the normal critical organs, resulting in the death of all animals within a few days following the injection of an activity of 37 to a few tens of kilobecquerels (death occurring more rapidly after high doses) [85]. In the second model of ovarian cancer, the authors used the MAb CC49 with a deletion of the Hu-delta CH2 domain, the theoretical advantage of which was better intratumoural penetration compared with the whole IgG CC49. This deleted Mab CC49 was expected to allow better retention of actinium-225 and its daughters within the tumour, thus lim-

iting the toxic effects. However, the tests carried out on mice did not demonstrate a significant antitumoural effect of  $^{225}\text{Ac}$ -Hu-delta CH2-CC49, and no difference in tumoural retention of the radionuclide and its daughters was reported with the two forms of  $^{225}\text{Ac}$ -RIC [86].

The efficacy of the humanised MAb trastuzumab (Herceptin) directed against HER2/neu, radiolabelled by actinium-225, was assessed on breast cancer spheroids (MCF7, MDA-MB-361 and BT-474 cell lines) expressing HER2/neu at different levels (1.4:18 respectively) [87]. Spheroid growths were delayed (MCF7 or MDA-MB-361) or spheroids failed to regrow (BT-474) after various radioactivity concentrations. The  $D_0$  (that reduced the treated to untreated spheroid volume ratio to 0.37) was 1.5, 3 and 2 kBq/ml, respectively. An in situ generator approach was proposed by the team from the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center with trastuzumab and MAb 3F8 (directed against ganglioside GD2, overexpressed by many neuroectodermal tumours, including neuroblastoma) [88–90]. In a mouse model of ovarian cancer (SKOV3), i.p. injection of the in vivo generator  $^{225}\text{Ac}$ -trastuzumab was able to significantly extend survival time at dose levels that did not produce any toxicity [88]. A prolongation of survival time was also observed in a nude rat xenograft model of meningeal carcinomatosis, after administration of  $^{225}\text{Ac}$ -3F8 [90]. In non-human primates (cynomolgus monkeys with no CD33 expression), the toxicity of atomic actinium generator was evaluated in two studies: (1) after intrathecal injections of  $^{225}\text{Ac}$ -3F8 [90], and (2) in a dose escalation schedule with intravenously injected activities up to 377 kBq/kg of  $^{225}\text{Ac}$ -MAb HuM195 (anti-CD33). In this last study, renal toxicity and anaemia were observed at high doses (377 kBq/kg), whereas doses of about 28 kBq/kg did not cause any toxicity; the latter therefore may be a safe starting dose in humans [89].

#### Human studies

There have been no human studies to date.

#### RIT $\alpha$ with conjugates of bismuth-213

##### Physicochemical properties of bismuth-213

The radiometal bismuth-213 has physical characteristics similar to those of bismuth-212. It decays (half-life 45.6 min) by a branched pathway by  $\alpha$ - and  $\beta$ -emissions to stable bismuth-209 (Fig. 4). The emitted energy (90.3%) is by  $\alpha$ -particles (major energy of 8.376 MeV). Due to a  $\gamma$  ray of 440 keV (26%), imaging of tumour uptake is possible and may be used to derive dosimetry [91].

##### Production of bismuth-213

Bismuth-213 is produced from the decay chain of actinium-225 (Fig. 4). A generator for clinical use has been devel-

oped; it is able to supply bismuth-213 for 10–15 days and requires a minimum amount of shielding [92, 93]. The Institute for Transuranium Elements of Karlsruhe (Germany) and the Oak Ridge National Laboratory (Tenn., USA) produced generators of actinium-225/bismuth-213 on inorganic resin AGMP-50, which is less radiolytic than previous organic resin. Further improvements have been proposed to separate bismuth-213 from actinium-225 in order to supply carrier-free bismuth-213 in amounts of about a few hundred megabecquerels of pure bismuth-213 [94] and to eluate the generator more simply and more rapidly so as to minimise the decay loss of the initial activity of bismuth-213 [95].

##### Antibody labelling

The first bifunctional chelate used to functionalise MABs and to bind bismuth-213 was *trans*-cyclohexyldiethylene triamine penta-acetic acid (CHX-A-DTPA) [64]. The time required for the radiolabelling procedures was about 30 min, a short enough time compared with the half-life of bismuth-213. The Memorial Sloan-Kettering Cancer team from New York pioneered RIT  $\alpha$  with bismuth-213. Murine MAB M195, its humanised HuM195 analogue (anti-CD33), and a specific anti-antigen MAB of prostate J591 have been conjugated to bismuth-213 via the bifunctional chelating agent *N*-[2-amino-3-(*p*-isothiocyanato-phenyl)propyl]-*trans*-cyclohexane-1,2-diamine-*N,N',N'',N''',N''''*-penta-acetic acid (CHX-A-DTPA) [96–98]. The complexation of the HuM195 with CHX-A-DTPA made it possible to build functionalised antibodies with several chelating agents (up to ten) by molecule of antibody, and the radiolabelling yield with bismuth-213 was higher than 80% with specific activities of 740 MBq/mg [97]. Using the same chelating agent, CHX-A-DTPA, Vandenbulcke et al. successfully radiolabelled rituximab (anti-CD20) with bismuth-213 [99]. Allen et al.'s team radiolabelled another anti-CD33 MAB (WM-53) with either bismuth-213 or terbium-149 via a cyclic anhydride of diethylene triamine penta-acetic acid (cDTPAa) [100]. Other ligands derived from DTPA were also synthesised, such as the *p*-isothiocyanatobenzyl-DTPA (CITC-DTPA) for the radiolabelling of B-B4 and MA5 (directed against a transmembrane heparan sulphate proteoglycan, syndecan-1, and transmembrane muc-1 respectively, both of which are expressed by multiple myeloma cells) [101, 102].

##### Preclinical in vitro and animal studies

The most documented model has been studied by the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center team, with the objective of preparing and guiding human trials. Several studies were carried out with the tumoural model of human myeloid leukaemia [103, 104]. The murine MAB M195 is directed against the CD33 antigen expressed by most of the cells of myeloid leukaemia and clonogenic progenitor of the leukaemia [105–108]. A humanised antibody HuM195 was constructed and is directed against the same antigenic

targets but without significant immunogenicity [109]. HuM195 is able to modulate the response of human blood mononuclear cells, resulting in the death of the leukaemic cells [105, 110]. Pharmacokinetic and biodistribution tests in mice showed good stability of  $^{213}\text{Bi}$ -RIC, a lack of uptake in healthy normal tissues which did not express CD33 antigen and a lack of renal activity, a natural route of elimination of the free bismuth [29]. Doses up to 740 MBq/kg of  $^{213}\text{Bi}$ -HuM195 were i.v. injected without any problem of tolerance, but doses of 2,590 MBq/kg resulted in the death of two out of three mice, and leucopenia in the survivor [15].

Another model of RIT  $\alpha$  was developed by the same team with a specific MAB, J591, directed against the prostate-specific membrane antigen. This therapeutic approach appeared of particular interest because the metastatic spread of prostatic cancer is via bone marrow migration of tumoural cells or clusters of tumoural cells, which are ideal targets for  $\alpha$ -particles. In a first in vitro study on spheroids of LNCaP-LN3 prostate carcinoma cells, a decrease in the spheroid volume was observed, and this decrease was related to the initial volume and the delivered dose [98]. In vivo cytotoxic tests were later performed on athymic mice bearing subcutaneous xenografts of LNCaP cells. The i.v. injection of  $^{213}\text{Bi}$ -J591 prolonged survival times significantly as compared with the i.v. injection of non-specific MAB  $^{213}\text{Bi}$ -HuM195 or the lack of injection of RIC. The prostate-specific antigen level was also significantly lowered in animals treated with  $^{213}\text{Bi}$ -J591 [111].

The effectiveness of  $^{213}\text{Bi}$ -MABs has also been studied in vitro using other models, with comparison to irrelevant MABs, MABs radiolabelled with  $\beta$ -emitters, free isotope, external irradiation or cold MAB. In a human epidermoid tumour cell line A431 model, Kaspersen et al. reported specific cell killing with a specific murine  $^{213}\text{Bi}$ -MAB, 2D11. The number of disintegrations per cell causing about 90% cell death was 30  $\alpha$ -particle disintegrations in monolayer cell culture versus one in multicell spheroid [79]. In multiple myeloma cell line models (U266, RPMI 8226 and LP1), the effectiveness of two specific  $^{213}\text{Bi}$ -MABs (B-B4 and MA5) was compared with that of non-specific  $^{213}\text{Bi}$ -IgG134 and that of B-B4 radiolabelled with iodine-131. With  $^{213}\text{Bi}$ -B-B4, excellent tumoural targeting was reported, resulting in a specific mortality 20 times that observed with the irrelevant  $^{213}\text{Bi}$ -IgG 134 or with  $^{131}\text{I}$ -B-B4 [112, 113]. Allen et al. have reported low  $D_0$  (37% cell survival) with different  $^{213}\text{Bi}$ -RICs (specific for melanoma, colorectal cancer or pancreatic cancer cell lines) compared with control RICs radiolabelled with  $\beta$ -emitter, control free isotope or control cold MAB [114, 115]. Recently, with a model of B cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL), Vandenbulcke et al. showed  $^{213}\text{Bi}$ -rituximab to be more effective than external  $\gamma$  irradiation. They calculated an RBE of 2 at low doses (<10 Gy) with respect to the induction of apoptosis (expressed as percentage excess over spontaneous apoptosis in control) and an RBE of 2–5 with respect to chromosomal damage [99]. In their latest study, these authors reported cell binding of  $^{213}\text{Bi}$ -rituximab to be significantly

higher for splenic lymphoma with villous lymphocytes (SLVL) than for B-CLL, resulting in greater induction of apoptosis in SLVL than in B-CLL [116]. An anti-colorectal cancer MAB, c30.6, radiolabelled with bismuth-213 or terbium-152 (a positron emitter), has been tested in vitro and in vivo [117]. In vitro, only the  $^{213}\text{Bi}$ -RIC was able to kill cancer cells, while in vivo high uptake and retention of both conjugates was seen in tumours whereas no retention was observed in the kidneys. These results demonstrated the efficiency and selectivity of the targeted  $\alpha$  therapy approach.

Another RIT  $\alpha$  approach consists in targeting tumoural vessels rather than a membrane MAB specific to only one type of tumour. Kennel and Mirzadeh have radiolabelled the MAB 201B with bismuth-213 via CHX-A-DTPA. This MAB is specific to murine thrombomodulin and targets lung micrometastases [118, 119]. Five primitive cancer cell lines were used to generate lung micrometastases in mice: mammary carcinoma EMT-6, murine lung carcinoma Line 1, murine tracheal carcinoma IC-12, human epidermoid carcinoma A431 and human lung cancer A549 [120]. For all the studied models, the radiobiological efficiency of  $^{213}\text{Bi}$ -MAB 201B resulted in a reduction in the number of micrometastases and a prolongation of survival in comparison with animal controls treated by an irrelevant  $^{213}\text{Bi}$ -RIC. The same group compared the efficiency of RIT  $\beta$  with yttrium-90 vs RIT  $\alpha$  with bismuth-213 by using the model of lung micrometastases of mammary carcinoma EMT-6 and the MAB 201B [121]. The radiobiological effects of both radionuclides resulted in a reduction in the lung lesion number, assessed by histology or microcomputed tomography [122]. For equivalent absorbed doses in the lung, yttrium-90 was slightly more effective for larger volume tumours than bismuth-213 but generated lung damage not observed with bismuth-213 [121].

$^{213}\text{Bi}$ -RICs have also been injected by the loco-regional route, to improve access to the tumour. Allen et al. showed that intra-lesional injection of a low dose of  $^{213}\text{Bi}$ -9.2.27, a radiolabelled MAB directed against a surface antigen expressed on most melanomas, completely inhibited the growth of subcutaneous xenografts of melanoma in nude mice [114]. More recently, studies on i.p. injection of  $^{213}\text{Bi}$ -d9MAb have shown high specific uptake in small intra-peritoneal nodules and a significant increase in the survival rate of nude mice bearing a HSC45-M2 human gastric cancer (expressing mutant d9-E-cadherin) compared with the survival times of animals treated with unspecific  $^{213}\text{Bi}$ -d8MAb [123, 124]. An analogous model of i.p. injections of  $^{213}\text{Bi}$ -MAB was also proposed in mice bearing human colon carcinoma subcutaneous xenografts (LS-174T) [125]. A single dose of 18.5–37 MBq of  $^{213}\text{Bi}$ -HuCC49deltaCH2 resulted in growth inhibition or regression of tumour xenograft, as well as prolongation of survival compared with that of animals treated with  $^{131}\text{I}$ -HuCC49deltaCH2.

A variant of one-step RIT  $\alpha$  consists in using fragments of MAB, such as single or double fragments of Fab or Fv. The single chains of Fv (scFv) quickly penetrate tumours and display fast blood clearance, making it possible to obtain excellent tumour/non-tumour ratios, but the absolute

quantity of scFv retained in tumours is low [126]. Thus, in this approach, the radionuclide half-life is of prime importance to the delivery of sufficient activity to the tumour. Intravenous injection of scFv and Fv of anti-HER2/neu C6.5K-A radiolabelled with bismuth-213 via CHX-A-DTPA was performed in mice bearing ovarian SK-OV-3 tumours. Activities of 11 MBq of  $^{213}\text{Bi}$ -C6.5K-A scFv and  $^{213}\text{Bi}$ -NM3E2 (irrelevant scFv) showed equivalent efficiency, suggesting that the half-life of bismuth-213 is too short to obtain a higher radiobiological effect with specific targeting [127].

An original three-step RIT  $\alpha$  approach was employed in a murine model of T cell leukaemia using a streptavidin-anti-Tac Mab (HAT-SA). This Mab is directed against the  $\alpha$ -receptor of interleukin-2 (IL-2R $\alpha$ : CD25) expressed by tumoural cells and was radiolabelled by the  $^{213}\text{Bi}$ -DOTA-biotin compound. In a first step, the HAT-SA Mab (140 or 400  $\mu\text{g}$ ) was i.v. administered to mice, to bind to CD25. After 24 h, the free HAT-SA was eliminated from the blood circulation by means of i.v. injection of 100  $\mu\text{g}$  of a clearance agent. Four hours later, the  $^{213}\text{Bi}$ -DOTA-biotin compound was i.v. administered at an activity of 9.25 MBq, and the radiobiological efficiency was demonstrated by a reduction in the serum level of soluble IL-2R $\alpha$  and/or  $\beta$ -2-microglobulin and by prolongation of survival. The survival time was further prolonged by four supplementary weekly i.v. injections of unradiolabelled HAT. On the other hand, no significant effect was observed with the irrelevant control antibody SA or with unradiolabelled HAT-SA only; furthermore, survival was not prolonged when radiolabelling was performed with yttrium-90 or even after injection of bismuth-213 uncoupled to any vector [128]. Another multiple-step biotin-streptavidin model employed a biotin Mab radiolabelled with bismuth-213 via DOTA in A431 tumour-bearing mice pretargeted with B3-streptavidin Mab (B3-SA) [129]. Doses lower than 37 MBq inhibited tumour growth and prolonged survival whereas a dose of 74 MBq was lethal in all animals.

#### Human studies

In 1996, the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center team started its first human study with bismuth-213 [130, 131] in patients with acute or chronic myeloid leukaemia. The antibody was the humanised Mab HuM195, specific to CD33 antigen, radiolabelled with bismuth-213 via the chelating agent CHX-A-DTPA [92]. Prior to this, a phase I trial with ten patients had shown that this Mab radiolabelled with iodine-131 was able to quickly and specifically target the leukaemia sites [132]. In a later study with dose escalation using the same  $^{131}\text{I}$ -RIC, the tumoural masses were significantly diminished in patients with refractory myeloid leukaemia or in relapse [133]. Treatments with supersaturating doses of cold HuM195 also made it possible to obtain complete remission in patients with acute promyeloid leukaemia at a later stage, but with a rate of circulating blasts lower than 30%, suggesting a better effi-

ciency for small tumoural masses [134]. On the other hand, this cold Mab only rarely achieved complete remission in patients with refractory acute myeloid leukaemia or in relapse [135]. On the basis of these data in humans and those obtained in animals, 18 patients with myeloid leukaemia (14 with acute myeloid leukaemia in relapse, including three who had benefited from a bone marrow transplant, three with acute myeloid leukaemia refractory to chemotherapy and one with chronic myeloid leukaemia in relapse) were included in a therapeutic phase I trial, with the aim of assessing the tolerance, pharmacokinetics and biological activity of  $^{213}\text{Bi}$ -HuM195. Patients received 10.36–37 MBq/kg of  $^{213}\text{Bi}$ -HuM195 in three to seven systemic injections in 2–4 days. Five dose levels were employed (10, 16, 21, 26 and 37 MBq/kg), yielding total doses from 602 to 3,515 MBq. Treatment was well supported without any accidental acute toxicity. The delayed toxicity was limited to (1) myelosuppression in all patients, characterised by a decrease in leucocytes and blasts in peripheral blood, which lasted an average of 22 days (12–41 days) and (2) transient, mild liver function abnormalities in five patients. Sampling of blood and scintigraphic scans centered on the 440-keV photopeak were performed, thereby obtaining dosimetric and biodistribution data. Uptake of bismuth-213 in bone, liver and spleen was observed from the tenth minute after administration, but no significant uptake was measured in other organs. The estimated doses to the bone marrow, liver and spleen were as much as 40,000 times higher than the doses estimated for kidneys or the whole body. The organ target/whole body ratios of absorbed doses with  $^{213}\text{Bi}$ -HuM195 were 1,000–10,000 times higher than the same dose ratios with  $\beta$ -emitters such as iodine-131 or yttrium-90 [91]. In 14/15 patients who had circulating blasts in the peripheral blood prior to the treatment, the biological effect of  $^{213}\text{Bi}$ -RIC resulted in a decrease in the number of bone marrow blasts. A reduction of 41  $\pm$ 22% in the number of leukaemic cells in the marrow 7–10 days after the treatment was observed in 14/18 patients, the reduction being dose dependent. This study remains the only RIT  $\alpha$  study in humans to date.

RIT  $\alpha$  with conjugates of other radionuclides

#### Lead-212

Lead-212 (half-life of 10.6 h) is produced from the decay chain of thorium-228 (Fig. 3) and can be obtained from a generator of radium-224. Lead-212 can be used as an in situ generator of bismuth-212 [136]. However, the destruction of RIC by Auger electrons and by electron capture is a major difficulty in radiolabelling a Mab with lead-212. Studies with lead-212 are limited to approaches using an in vivo generator, such as that described in the article by Horak et al. [78], in which bismuth-212 is the source of  $\alpha$ -particles. A preliminary study in mice showed severe bone marrow toxicity with radiolabelled Mab  $^{212}\text{Pb}$ -DOTA-103A, which was responsible for the death of all animals [137].

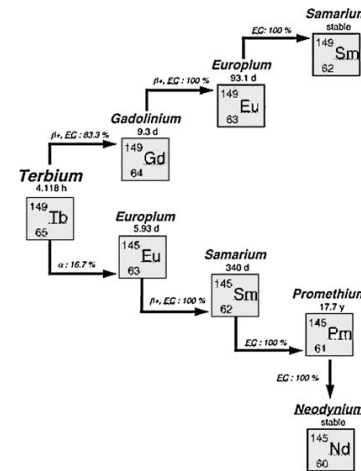


Fig. 5. Decay of terbium-149. Terbium-149 decays (4.118 h) either by  $\alpha$ -emission to europium-145 (16.7%) or by  $\beta^+$ -emission and electron capture to gadolinium-149. The stable isotopes of each pathway are neodymium-145 and samarium-149, respectively

#### Radium-223

Radium-223 (half-life of 11.4 days) can be obtained from a generator of actinium-227 (21.8 years)/radium-223 [138]. It decays by four  $\alpha$ -emissions and two  $\beta$ -emissions to stable lead-207. These four  $\alpha$ -emissions confer an advantage from a therapeutic point of view, but also represent a drawback for stable radiolabelling. Furthermore, radon-219 gas emitted during the decay of radium-223 can redistribute in the body and be responsible for toxicity to healthy normal tissues. A recent and original approach was to load radium-223 or -224 into liposomes coated with folate-F(ab') $_2$  to target tumoural cells expressing folate receptor [139].

#### Terbium-149

Terbium-149 is a radiolanthanide which decays (half-life of 4.118 h) by  $\alpha$ -emission (3.967 MeV, 17%), positron  $\beta^+$  emission (4%) and electron capture (79%) [140] (Fig. 5). Because of the high energy of 3.8 MeV, the very short path length in normal tissues (28  $\mu\text{m}$ ) with a LET of 142 keV/ $\mu\text{m}$  and the high RBE of its  $\alpha$ -emission, terbium-149 appears to be a fitting candidate for the treatment of micrometastases [140]. The production of terbium-149 is difficult, being achieved either by a double reaction  $^{142}\text{Nd}(^{12}\text{C}, 5n)^{149}\text{Dy}$   $^{149}\text{Tb}$  at 70–100 MeV (Australian National University) or by bombardment of a sheet of tantalum [CERN synchrotron, ISOLDE facility (Geneva)]. The biodistribution and possible toxicity of its daughters require assess-

ment because the chemical lanthanide family is known for its bone seeking. A recent in vitro study compared the radiotoxicity of a tumour-specific Mab [directed against mutated delta 9 E-cadherin (d9 E-Cad)] radiolabelled with either terbium-149 or bismuth-213 in a model of human breast cancer cells transfected with d9 E-Cad or with the wild type E-cadherin gene [141]. The radiobiological effects of RICs were assessed by  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation, showing lower proliferation of d9 E-Cad-expressing cells compared with wild type E-cadherin-expressing cells. With bismuth-213 RICs, the non-specific irradiation was greater in wild type E-cadherin-expressing suspended cells than in pelleted wild type E-cadherin-expressing cells, whereas no difference was observed with terbium-149 RICs. Another study has demonstrated the high efficiency of terbium-149 rituximab in a murine model of leukaemia (intravenous xenografts of Daudi cells), with tumour-free survival for >120 days in 89% of treated animals [142].

#### Conclusion

This review documents the efforts made to develop  $\alpha$ -emitting radio-immunoconjugates for RIT  $\alpha$  in cancer patients. Preclinical studies have generated encouraging results, but to date only one human study has been initiated and this was almost 10 years ago. Despite the proof of concept for the use of RIT  $\alpha$  provided by this first human study, clinical human studies of RIT  $\alpha$  remain difficult to achieve. This is partly due to the lack of data concerning normal organ dosimetry and the biokinetics of multiple unstable daughters of these  $\alpha$ -emitters. The identification of an easily and rapidly accessible tumoural target and the avoidance of irradiation of healthy normal tissue also remain significant issues. Because the treatment of a large tumour will probably require high or repeated injected activities, and thus will entail a high risk of normal tissue damage, alpha immunotherapy seems more suitable for the treatment of residual or microscopic disease. The short path length of  $\alpha$ -particles in biological tissues is an additional argument for applying RIT  $\alpha$  to a small tumoural target. Another point to be considered is the availability of  $\alpha$ -emitters; for instance, in our institution just four or five actinium-225/bismuth-213 generators are usable for only 2 weeks each per year, and this considerably hampers a clinical study. The clinical and economic feasibility of such RIT at therapeutic and repeated doses remains an important and unanswered problem. However, over the past decade, significant advances have progressively led to increased interest in the use of RIT  $\alpha$ . This progress should contribute to the growing success of RIT  $\alpha$ .

#### References

- DeNardo SJ, DeNardo GL, O Grady LF, et al. Treatment of B cell malignancies with  $^{131}\text{I}$  Lym-1 monoclonal antibodies. Int J Cancer Suppl 1988;3:96–101.

2. Kaminski MS, Fig LM, Zasadny KR, et al. Imaging, dosimetry, and radioimmunotherapy with iodine 131-labeled anti-CD37 antibody in B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 1992;10:1696–711.
3. Kaminski MS, Zasadny KR, Francis IR, et al. Radioimmunotherapy of B-cell lymphoma with <sup>131</sup>I]anti-B1 (anti-CD20) antibody. *N Engl J Med* 1993;329:459–65.
4. Kaminski MS, Estes J, Zasadny KR, et al. Radioimmunotherapy with iodine (131I) tositumomab for relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: updated results and long-term follow-up of the University of Michigan experience: imaging, dosimetry, and radioimmunotherapy with iodine 131-labeled anti-CD37 antibody in B-cell lymphoma. *Blood* 2000;96:1259–66.
5. Witzig TE, White CA, Wiseman GA, et al. Phase I/II trial of IDEC-Y2B8 radioimmunotherapy for treatment of relapsed or refractory CD20(+) B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1999;17:3793–803.
6. Witzig TE, Flinn IW, Gordon LI, et al. Treatment with ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy in patients with rituximab-refractory follicular non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2002;20:3262–9.
7. Vuillez JP, Kraeber-Bodere F, Moro D, et al. Radioimmunotherapy of small cell lung carcinoma with the two-step method using a bispecific anti-carcinoembryonic antigen/anti-diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) antibody and iodine-131 D1-DTPA hapten: results of a phase I/II trial. *Clin Cancer Res* 1999;5:3259–67.
8. Goldenberg DM. Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies. *J Nucl Med* 2002;43:693–713.
9. Chatal J-F, Mahé M. Therapeutic use of radiolabeled antibodies. In: Murray IPC, Eli PJ, editors. Nuclear medicine in clinical diagnosis and treatment. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1998.
10. Alvarez RD, Huh WK, Khazaeli MB, et al. A phase I study of combined modality (90Y)yttrium-CC49 intraperitoneal radioimmunotherapy for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:2806–11.
11. Mahe MA, Fumoleau P, Fabbro M, et al. A phase II study of intraperitoneal radioimmunotherapy with iodine-131-labeled monoclonal antibody OC-125 in patients with residual ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999;5:3249–53.
12. Kraeber-Bodere F, Bardet S, Hoefnagel CA, et al. Radioimmunotherapy in medullary thyroid cancer using bispecific antibody and iodine 131-labeled bivalent hapten: preliminary results of a phase I/II clinical trial. *Clin Cancer Res* 1999;5:3190–8.
13. Kraeber-Bodere F, Faivre-Chauvet A, Sai-Maurel C, et al. Toxicity and efficacy of radioimmunotherapy in carcinoembryonic antigen-producing medullary thyroid cancer xenograft: comparison of iodine 131-labeled F(ab)2 and pretargeted bivalent hapten and evaluation of repeated injections. *Clin Cancer Res* 1999;5:3183–9.
14. Kraeber-Bodere F, Faivre-Chauvet A, Sai-Maurel C, et al. Bispecific antibody and bivalent hapten radioimmunotherapy in CEA-producing medullary thyroid cancer xenograft. *J Nucl Med* 1999;40:198–204.
15. Nikula TK, McDevitt MR, Finn RD, et al. Alpha-emitting bismuth cyclohexylbenzyl DTPA constructs of recombinant humanized anti-CD33 antibodies: pharmacokinetics, bioactivity, toxicity and chemistry. *J Nucl Med* 1999;40:166–76.
16. Raju MR, Eisen Y, Carpenter S, et al. Radiobiology of alpha-particles: part III. Cell inactivation by alpha-particle traversals of the cell nucleus. *Radiat Res* 1991;128:204–9.
17. Humm JL, Roeske JC, Fisher DR, et al. Microdosimetric concepts in radioimmunotherapy. *Med Phys* 1993;20:535–41.
18. Unak T. Some microdosimetric data on astatine-211. *Appl Radiat Isotopes* 2003;58:115–7.
19. Humm JL. A microdosimetric model of astatine-211 labeled antibodies for radioimmunotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1987;13:1767–73.
20. Tung CJ, Liu CS, Wang JP, et al. Calculations of cellular microdosimetry parameters for alpha particles and electrons. *Appl Radiat Isotopes* 2004;61:739–43.
21. Slinchcomb TG, Roeske JC. Analytic microdosimetry for radioimmunotherapeutic alpha emitters. *Med Phys* 1992;19:1385–93.
22. Charlton DE. Radiation effects in spheroids of cells exposed to alpha emitters. *Int J Radiat Biol* 2000;76:1555–64.
23. Charlton DE. The survival of monolayers of cells growing in clusters irradiated by <sup>211</sup>At appended to the cell surfaces. *Radiat Res* 1999;151:750–3.
24. Hamacher KA, Den RB, Den EI, et al. Cellular dose conversion factors for alpha-particle-emitting radionuclides of interest in radionuclide therapy. *J Nucl Med* 2001;42:1216–21.
25. Hamacher KA, Sgourou G. Theoretical estimation of absorbed dose to organs in radioimmunotherapy using radionuclides with multiple unstable daughters. *Med Phys* 2001;28:1857–74.
26. Hamacher KA, Sgourou G. A schema for estimating absorbed dose to organs following the administration of radionuclides with multiple unstable daughters: a matrix approach. *Med Phys* 1999;26:2526–8.
27. Chatal JF, Saccavini JC, Gestin JF, et al. Biodistribution of indium-111-labeled OC 125 monoclonal antibody intraperitoneally injected into patients operated on for ovarian carcinomas. *Cancer Res* 1989;49:3087–94.
28. Humm JL, Chin LM. A model of cell inactivation by alpha-particle internal emitters. *Radiat Res* 1993;134:143–50.
29. McDevitt MR, Sgourou G, Finn RD, et al. Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur J Nucl Med* 1998;25:1341–51.
30. Yao Z, Garmestani K, Wong KJ, et al. Comparative cellular catabolism and retention of astatine-, bismuth-, and lead-radiolabeled internalizing monoclonal antibody. *J Nucl Med* 2001;42:1538–44.
31. Smit JA, Myburgh JA, Neirinx RD. Specific inactivation of sensitized lymphocytes in vitro using antigens labelled with astatine-211. *Clin Exp Immunol* 1973;14:107–16.
32. Zalutsky MR, Vaidyanathan G. Astatine-211-labeled radiotherapeutics: an emerging approach to targeted alpha-particle radiotherapy. *Curr Pharm Des* 2000;6:1433–55.
33. Zalutsky MR, Zhao XG, Alston KL, et al. High-level production of alpha-particle-emitting <sup>211</sup>At and preparation of <sup>211</sup>At-labeled antibodies for clinical use. *J Nucl Med* 2001;42:1508–15.
34. Zalutsky MR, Bigner DD. Radioimmunotherapy with alpha-particle emitting radioimmunconjugates. *Acta Oncol* 1996;35:373–9.
35. Johnson EL, Turkington TG, Jaszczak RJ, et al. Quantitation of <sup>211</sup>At in small volumes for evaluation of targeted radiotherapy in animal models. *Nucl Med Biol* 1995;22:45–54.
36. Larsen RH, Murud KM, Akabani G, et al. <sup>211</sup>At- and <sup>131</sup>I-labeled bisphosphonates with high in vivo stability and bone accumulation. *J Nucl Med* 1999;40:1197–203.
37. Larsen RH, Wieland BW, Zalutsky MR. Evaluation of an internal cyclotron target for the production of <sup>211</sup>At via the <sup>209</sup>Bi(alpha,n)<sup>211</sup>At reaction. *Appl Radiat Isotopes* 1996;47:135–43.
38. Zalutsky MR, Narula AS. Astatination of proteins using an *N*-succinimidyl tri-*n*-butylstannyl benzoate intermediate. *Int J Radiat Appl Instrum A* 1988;39:227–32.
39. Zalutsky MR, Garg PK, Friedman HS, et al. Labeling monoclonal antibodies and F(ab)2 fragments with the alpha-particle-emitting nuclide astatine-211: preservation of immunoreactivity and in vivo localizing capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:7149–53.
40. Bloomer WD, McLaughlin WH, Neirinx RD, et al. Astatine-211-tellurium radiocolloid cures experimental malignant ascites. *Science* 1981;212:340–1.

41. Brown I, Carpenter RN, Mitchell JS. The development of a [<sup>211</sup>At]-astatinated endoradiotherapeutic drug: part I. Localization by alpha-particle autoradiography in a murine tumor model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992;23:563–72.
42. Brown I, Mitchell JS. The development of a [<sup>211</sup>At]-astatinated endoradiotherapeutic drug: part II. Therapeutic results for transplanted adenocarcinoma of the rectum in mice and associated studies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;29:115–24.
43. Link EM. Targeting melanoma with <sup>211</sup>At/<sup>131</sup>I-methylene blue: preclinical and clinical experience. *Hybridoma* 1999;18:77–82.
44. Vaidyanathan G, Zalutsky MR. 1-*m*-[<sup>211</sup>At]astatobenzylo)guanidine: synthesis via astatine demetalation and preliminary in vitro and in vivo evaluation. *Bioconj Chem* 1992;3:499–503.
45. Vaidyanathan G, Larsen RH, Zalutsky MR. 5-[<sup>211</sup>At]astato-2'-deoxyuridine, an alpha particle-emitting endoradiotherapeutic agent undergoing DNA incorporation. *Cancer Res* 1996;56:1204–9.
46. Foulon CF, Alston KL, Zalutsky MR. Astatine-211-labeled biotin conjugates resistant to biotinidase for use in pretargeted radioimmunotherapy. *Nucl Med Biol* 1998;25:81–8.
47. Murud KM, Larsen RH, Bruland OS, et al. Influence of pre-treatment with 3-amino-1-hydroxypropylidene-1,1-bisphosphonate (APB) on organ uptake of <sup>211</sup>At and <sup>125</sup>I-labeled amidobisphosphonates in mice. *Nucl Med Biol* 1999;26:791–4.
48. Murud KM, Larsen RH, Hoff P, et al. Synthesis, purification, and in vitro stability of <sup>211</sup>At- and <sup>125</sup>I-labeled amidobisphosphonates. *Nucl Med Biol* 1999;26:397–403.
49. Wilbur DS, Vessella RL, Stray JE, et al. Preparation and evaluation of para-[<sup>211</sup>At]astatobenzylo) labeled anti-renal cell carcinoma antibody A6H F(ab)2. In vivo distribution comparison with para-[<sup>125</sup>I]iodobenzylo) labeled A6H F(ab)2. *Nucl Med Biol* 1993;20:917–27.
50. Larsen RH, Bruland OS. Intratumour injection of immunoglobulins labelled with the alpha-particle emitter <sup>211</sup>At: analyses of tumour retention, microdistribution and growth delay. *Br J Cancer* 1998;77:1115–22.
51. Aurlieu E, Larsen RH, Kvalheim G, et al. Demonstration of highly specific toxicity of the alpha-emitting radioimmunconjugate <sup>211</sup>At-rituximab against non-Hodgkin's lymphoma cells. *Br J Cancer* 2000;83:1375–9.
52. Yordanov AT, Garmestani K, Zhang M, et al. Preparation and in vivo evaluation of linkers for <sup>211</sup>At labeling of humanized anti-Tac. *Nucl Med Biol* 2001;28:845–56.
53. Strickland DK, Vaidyanathan G, Zalutsky MR. Cytotoxicity of alpha-particle-emitting *m*-[<sup>211</sup>At]astatobenzylo)guanidine on human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 1994;54:5414–9.
54. Larsen RH, Akabani G, Welsh P, et al. The cytotoxicity and microdosimetry of astatine-211-labeled chimeric monoclonal antibodies in human glioma and melanoma cells in vitro. *Radiat Res* 1998;149:155–62.
55. Walicka MA, Vaidyanathan G, Zalutsky MR, et al. Survival and DNA damage in Chinese hamster V79 cells exposed to alpha particles emitted by DNA-incorporated astatine-211. *Radiat Res* 1998;150:263–8.
56. Zalutsky MR, Schuster JM, Garg PK, et al. Two approaches for enhancing radioimmunotherapy: alpha emitters and hyperthermia. *Recent Results Cancer Res* 1996;141:101–22.
57. Hauck ML, Larsen RH, Welsh PC, et al. Cytotoxicity of alpha-particle-emitting astatine-211-labelled antibody in tumour spheroids: no effect of hyperthermia. *Br J Cancer* 1998;77:753–9.
58. Harrison A, Royle L. Efficacy of astatine-211-labeled monoclonal antibody in treatment of murine T-cell lymphoma. *NCI Monogr* 1987;157–8.
59. Zalutsky MR, McLendon RE, Garg PK, et al. Radioimmunotherapy of neoplastic meningitis in rats using an alpha-particle-emitting immunconjugate. *Cancer Res* 1994;54:4719–25.
60. Andersson H, Palm S, Lindegren S, et al. 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 Res* 2001;21:409–12.
61. Zalutsky MR, Cokgor I, Akabani G, et al. Phase I trial of alpha-particle-emitting astatine-211 labeled chimeric antitenascin antibody in recurrent malignant glioma patients. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2000;41:54.
62. Atcher RW, Friedman AM, Hines JJ. An improved generator for the production of <sup>212</sup>Pb and <sup>212</sup>Bi from <sup>223</sup>Ra. *Int J Radiat Appl Instrum A* 1988;39:283–6.
63. Kozak RW, Atcher RW, Gansow OA, et al. Bismuth-212-labeled anti-Tac monoclonal antibody: alpha-particle-emitting radionuclides as modalities for radioimmunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:474–8.
64. Brechbiel MW, Gansow OA. Synthesis of C-functionalized *trans*-cyclohexyldiethylenetriaminepentaacetic acids for labeling of monoclonal antibodies with the bismuth-212- $\alpha$ -particle emitter. *J Chem Soc Perkin Trans* 1992;1:1173–8.
65. Macklis RM, Lin JY, Beresford B, et al. Cellular kinetics, dosimetry, and radiobiology of alpha-particle radioimmunotherapy: induction of apoptosis. *Radiat Res* 1992;130:220–6.
66. Huneke RB, Pippin CG, Squire RA, et al. Effective alpha-particle-mediated radioimmunotherapy of murine leukemia. *Cancer Res* 1992;52:5818–20.
67. Ruegg CL, Anderson-Berg WT, Brechbiel MW, et al. Improved in vivo stability and tumour targeting of bismuth-labeled antibody. *Cancer Res* 1990;50:4221–6.
68. Junghans RP, Dobbs D, Brechbiel MW, et al. Pharmacokinetics and bioactivity of 1,4,7,10-tetra-azacyclododecane off <sup>212</sup>Bi, <sup>212</sup>Bi-tetraacetic acid (DOTA)-bismuth-conjugated anti-Tac antibody for alpha-emitter (<sup>212</sup>Bi) therapy. *Cancer Res* 1993;53:5683–9.
69. Macklis RM, Kinsey BM, Kassis AI, et al. Radioimmunotherapy with alpha-particle-emitting immunoconjugates. *Science* 1988;240:1024–6.
70. Macklis RM, Kaplan WD, Ferrara JL, et al. Alpha particle radioimmunotherapy: animal models and clinical prospects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989;16:1377–87.
71. Hartmann F, Horak EM, Garmestani K, et al. Radioimmunotherapy of nude mice bearing a human interleukin 2 receptor alpha-expressing lymphoma utilizing the alpha-emitting radionuclide-conjugated monoclonal antibody <sup>212</sup>Bi-anti-Tac. *Cancer Res* 1994;54:4362–70.
72. Scheinberg DA, Strand M. Leukemic cell targeting and therapy by monoclonal antibody in a mouse model system. *Cancer Res* 1982;42:44–9.
73. Scheinberg DA, Strand M. Kinetic and catabolic considerations of monoclonal antibody targeting in erythroleukemic mice. *Cancer Res* 1983;43:265–72.
74. Simonson RB, Ultee ME, Hauler JA, et al. Radioimmunotherapy of peritoneal human colon cancer xenografts with site-specifically modified <sup>212</sup>Bi-labeled antibody. *Cancer Res* 1990;50:985–8.
75. Rotmensch J, Roeske J, Chen G, et al. Estimates of dose to intraperitoneal micrometastases from alpha and beta emitters in radioimmunotherapy. *Gynecol Oncol* 1990;38:478–85.
76. Rotmensch J, Schwartz JL, Atcher RW, et al. Increased nuclear damage by high linear energy transfer radioisotopes applicable for radiodirected therapy against radiologic malignancies. *Gynecol Obstet Invest* 1991;32:180–4.
77. Rotmensch J, Whitlock JL, Schwartz JL, et al. In vitro and in vivo studies on the development of the alpha-emitting radionuclide bismuth 212 for intraperitoneal use against microscopic ovarian carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176:833–40; discussion 840–1.

78. Horak E, Hartmann F, Garmestani K, et al. Radioimmunotherapy targeting of HER2/neu oncoprotein on ovarian tumor using lead-212-DOTA-AE1. *J Nucl Med* 1997;38:1944–50.
79. Kaspersen FM, Bos E, Doornmalen AV, et al. Cytotoxicity of <sup>213</sup>Bi- and <sup>225</sup>Ac-immunoconjugates. *Nucl Med Commun* 1995; 16:468–76.
80. Geerlings MW, Kaspersen FM, Apostolidis C, et al. The feasibility of <sup>225</sup>Ac as a source of alpha-particles in radioimmunotherapy. *Nucl Med Commun* 1993;14:121–5.
81. Geerlings MW. Radionuclides for radioimmunotherapy: criteria for selection. *Int J Biol Markers* 1993;8:180–6.
82. Davis IA, Glowienka KA, Boli RA, et al. Comparison of 225-actinium chelates: tissue distribution and radiotoxicity. *Nucl Med Biol* 1999;26:581–9.
83. Chappell LL, Deal KA, Dadachova E, et al. Synthesis, conjugation, and radiolabeling of a novel bifunctional chelating agent for <sup>225</sup>Ac radioimmunotherapy applications. *Bioconjug Chem* 2000;11:510–9.
84. McDevitt MR, Ma D, Lai LT, et al. Tumor therapy with targeted atomic nanogenerators. *Science* 2001;294:1537–40.
85. Kennel SJ, Chappell LL, Dadachova K, et al. Evaluation of <sup>225</sup>Ac for vascular targeted radioimmunotherapy of lung tumors. *Cancer Biother Radiopharm* 2000;15:235–44.
86. Kennel SJ, Brechbiel MW, Milenic DE, et al. Actinium-225 conjugates of MAb CC49 and humanized delta CH2CC49. *Cancer Biother Radiopharm* 2002;17:219–31.
87. Ballangrud AM, Yang WH, Palm S, et al. Alpha-particle emitting atomic generator (actinium-225)-labeled trastuzumab (herceptin) targeting of breast cancer spheroids: efficacy versus HER2/neu expression. *Clin Cancer Res* 2004;10:4489–97.
88. Borchardt PE, Yuan RR, Miederer M, et al. Targeted actinium-225 in vivo generators for therapy of ovarian cancer. *Cancer Res* 2003;63:5084–90.
89. Miederer M, McDevitt MR, Sgouros G, et al. Pharmacokinetics, dosimetry, and toxicity of the targetable atomic generator, <sup>225</sup>Ac-HuM195, in nonhuman primates. *J Nucl Med* 2004;45: 129–37.
90. Miederer M, McDevitt MR, Borchardt P, et al. Treatment of neuroblastoma meningeal carcinomatosis with intrathecal application of alpha-emitting atomic nanogenerators targeting disialoganglioside GD2. *Clin Cancer Res* 2004;10:6985–92.
91. Sgouros G, Ballangrud AM, Jurcic JG, et al. Pharmacokinetics and dosimetry of an alpha-particle emitter labeled antibody: <sup>213</sup>Bi-HuM195 (anti-CD33) in patients with leukemia. *J Nucl Med* 1999;40:1935–46.
92. McDevitt MR, Finn RD, Ma D, et al. Preparation of alpha-emitting <sup>213</sup>Bi-labeled antibody constructs for clinical use. *J Nucl Med* 1999;40:1722–7.
93. Finn RD, McDevitt MR, Scheinberg DA. Refinements and improvements for Bi-213 production and use as a targeted therapeutic radiopharmaceutical. *J Label Compd Radiopharm* 1997; 40:293.
94. Ma D, McDevitt MR, Finn RD, et al. Breakthrough of <sup>225</sup>Ac and its radionuclide daughters from a <sup>225</sup>Ac/<sup>213</sup>Bi generator: development of new methods, quantitative characterization, and implications for clinical use. *Appl Radiat Isotopes* 2001;55:667–78.
95. Ma D, McDevitt MR, Finn RD, et al. Rapid preparation of short-lived alpha particle emitting radioimmunopharmaceuticals. *Appl Radiat Isotopes* 2001;55:463–70.
96. Jurcic JG, Scheinberg DA, Houghton AN. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Cancer Chemother Biol Response Modif Annu* 1997;17:195–216.
97. Jurcic JG, Caron PC, Nikula TK, et al. Radiolabeled anti-CD33 monoclonal antibody M195 for myeloid leukemias. *Cancer Res* 1995;55:5908–10s.
98. Ballangrud AM, Yang WH, Charlton DE, et al. Response of LNCaP spheroids after treatment with an alpha-particle emitter (<sup>213</sup>Bi)-labeled anti-prostate-specific membrane antigen antibody (J591). *Cancer Res* 2001;61:2008–14.
99. Vandenbulcke K, De Vos F, Offner F, et al. In vitro evaluation of <sup>213</sup>Bi-rituximab versus external gamma irradiation for the treatment of B-CLL patients: relative biological efficacy with respect to apoptosis induction and chromosomal damage. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003;3:3.
100. Abbas Rizvi SM, Henniker AJ, Goozee G, et al. In vitro testing of the leukaemia monoclonal antibody WM-53 labeled with alpha and beta emitting radioisotopes. *Leuk Res* 2002;26:37–43.
101. Mishra AK, Iznaga-Escobar N, Figueredo R, et al. Preparation and comparative evaluation of <sup>90m</sup>Tc-labeled 2-Iminothiolane modified antibodies and CITC-DTPA immunoconjugates of anti-EGF-receptor antibodies. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2002;24:653–60.
102. Brechbiel MW, Gansow OA, Atcher RW, et al. Synthesis of 1-(*p*-Isothiocyanatobenzyl) Derivatives of DTPA and EDTA. *Inorg Chem* 1986;25:2772–81.
103. de The H, Chomienne C, Lanotte M, et al. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature* 1990;347:558–61.
104. Kakizuka A, Miller WH Jr, Umesono K, et al. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* 1991;66:663–74.
105. Caron PC, Co MS, Bull MK, et al. Biological and immunological features of humanized M195 (anti-CD33) monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1992;52:6761–7.
106. Scheinberg DA, Tanimoto M, McKenzie S, et al. Monoclonal antibody M195: a diagnostic marker for acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 1989;3:440–5.
107. Tanimoto M, Scheinberg DA, Cordon-Cardo C, et al. Restricted expression of an early myeloid and monocytic cell surface antigen defined by monoclonal antibody M195. *Leukemia* 1989; 3:339–48.
108. Sabbath KD, Ball ED, Larcom P, et al. Heterogeneity of clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. *J Clin Invest* 1985;75:746–53.
109. Caron PC, Jurcic JG, Scott AM, et al. A phase 1B trial of humanized monoclonal antibody M195 (anti-CD33) in myeloid leukemia: specific targeting without immunogenicity. *Blood* 1994;83:1760–8.
110. Co MS, Avdalovic NM, Caron PC, et al. Chimeric and humanized antibodies with specificity for the CD33 antigen. *J Immunol* 1992;148:1149–54.
111. McDevitt MR, Barendsward E, Ma D, et al. An alpha-particle emitting antibody (<sup>213</sup>BiJ591) for radioimmunotherapy of prostate cancer. *Cancer Res* 2000;60:6095–100.
112. Supiot S, Favier-Chauvet A, Couturier O, et al. Comparison of the biologic effects of MA5 and B-B4 monoclonal antibody labeled with iodine-131 and bismuth-213 on multiple myeloma. *Cancer* 2002;94:1202–9.
113. Couturier O, Favier-Chauvet A, Filippovich IV, et al. Validation of <sup>213</sup>Bi-alpha radioimmunotherapy for multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 1999;5:3165–70s.
114. Allen BJ, Rizvi S, Li Y, et al. In vitro and preclinical targeted alpha therapy for melanoma, breast, prostate and colorectal cancers. *Crit Rev Oncol/Hematol* 2001;39:139–46.
115. Allen BJ, Raja C, Rizvi S, et al. Targeted alpha therapy for cancer. *Phys Med Biol* 2004;49:3703–12.

116. Vandenbulcke K, Thierens H, Offner F, et al. Importance of receptor density in alpha radioimmunotherapy in B cell malignancies: an in-vitro study. *Nucl Med Commun* 2004;25:1131–6.
117. Rizvi SM, Allen BJ, Tian Z, et al. In vitro and preclinical studies of targeted alpha therapy (TAT) for colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2001;3:345–53.
118. Kennel SJ, Mirzadeh S. Vascular targeted radioimmunotherapy with <sup>213</sup>Bi an alpha-particle emitter. *Nucl Med Biol* 1998;25: 241–6.
119. Davis IA, Kennel SJ. Radioimmunotherapy using vascular targeted <sup>213</sup>Bi: the role of tumor necrosis factor alpha in the development of pulmonary fibrosis. *Clin Cancer Res* 1999;5: 3160–4s.
120. Kennel SJ, Boli R, Stabin M, et al. Radioimmunotherapy of micrometastases in lung with vascular targeted <sup>213</sup>Bi. *Br J Cancer* 1999;80:175–84.
121. Kennel SJ, Stabin M, Yoriyaz H, et al. Treatment of lung tumor colonies with <sup>90</sup>Y targeted to blood vessels: comparison with the alpha-particle emitter <sup>213</sup>Bi. *Nucl Med Biol* 1999;26:149–57.
122. Kennel SJ, Davis IA, Branning J, et al. High resolution computed tomography and MRI for monitoring lung tumor growth in mice undergoing radioimmunotherapy: correlation with histology. *Med Phys* 2000;27:1101–7.
123. Huber R, Seidl C, Schmid E, et al. Locoregional alpha-radioimmunotherapy of intraperitoneal tumor cell dissemination using a tumor-specific monoclonal antibody. *Clin Cancer Res* 2003;9:3922–8S.
124. Senekowitsch-Schmidtke R, Schuhmacher C, Becker KF, et al. Highly specific tumor binding of a <sup>213</sup>Bi-labeled monoclonal antibody against mutant E-cadherin suggests its usefulness for locoregional alpha-radioimmunotherapy of diffuse-type gastric cancer. *Cancer Res* 2001;61:2804–8.
125. Milenic D, Garmestani K, Dadachova E, et al. Radioimmunotherapy of human colon carcinoma xenografts using a <sup>213</sup>Bi-labeled domain-deleted humanized monoclonal antibody. *Cancer Biother Radiopharm* 2004;19:135–47.
126. Nielsen UB, Adams GP, Weiner LM, et al. Targeting of bivalent anti-ErbB2 diabody antibody fragments to tumor cells is independent of the intrinsic antibody affinity. *Cancer Res* 2000; 60:6434–40.
127. Adams GP, Shaller CC, Chappell LL, et al. Delivery of the alpha-emitting radioisotope bismuth-213 to solid tumors via single-chain Fv and diabody molecules. *Nucl Med Biol* 2000; 27:339–46.
128. Zhang M, Yao Z, Garmestani K, et al. Pretargeted radioimmunotherapy of a murine model of adult T-cell leukemia with the alpha-emitting radionuclide, bismuth 213. *Blood* 2002; 100:208–16.
129. Yao Z, Zhang M, Garmestani K, et al. Pretargeted alpha emitting radioimmunotherapy using <sup>213</sup>Bi 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid-biotin. *Clin Cancer Res* 2004;10:3137–46.
130. Jurcic JG. Antibody therapy for residual disease in acute myelogenous leukemia. *Crit Rev Oncol/Hematol* 2001;38:37–45.
131. Jurcic JG, Larson SM, Sgouros G, et al. Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. *Blood* 2002;100:1233–9.
132. Scheinberg DA, Lovett D, Divgi CR, et al. A phase I trial of monoclonal antibody M195 in acute myelogenous leukemia: specific bone marrow targeting and internalization of radionuclide. *J Clin Oncol* 1991;9:478–90.
133. Schwartz MA, Lovett DR, Redner A, et al. Dose-escalation trial of M195 labeled with iodine 131 for cytorreduction and marrow ablation in relapsed or refractory myeloid leukemias. *J Clin Oncol* 1993;11:294–303.
134. Jurcic JG, DeBlasio T, Dumont L, et al. Molecular remission induction with retinoic acid and anti-CD33 monoclonal antibody HuM195 in acute promyelocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2000;6:372–80.
135. Caron PC, Dumont L, Scheinberg DA. Supersaturating infusional humanized anti-CD33 monoclonal antibody HuM195 in myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 1998;4:1421–8.
136. Mausner LF, Straub RE, Srivastava SC. The in vivo generator for radioimmunotherapy. *J Label Compd Radiopharm* 1989; 26:177–8.
137. Ruble G, Wu C, Squire RA, et al. The use of <sup>212</sup>Pb-labeled monoclonal antibody in the treatment of murine erythroleukemia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;34:609–16.
138. Atcher RW, Friedman AM, Huizenga JR, et al. A radionuclide generator for the production of Pb-211 and its daughters. *J Radioanal Nucl Chem* 1989;135:215–21.
139. Henriksen G, Schoultz BW, Michaelsen TE, et al. Sterically stabilized liposomes as a carrier for alpha-emitting radium and actinium radionuclides. *Nucl Med Biol* 2004;31:441–9.
140. Allen BJ, Blagojevic N. Alpha- and beta-emitting radio-lanthanides in targeted cancer therapy: the potential role of terbium-149. *Nucl Med Commun* 1996;17:40–7.
141. Miederer M, Seidl C, Beyer GJ, et al. Comparison of the radiotoxicity of two alpha-particle-emitting immunoconjugates, terbium-149 and bismuth-213, directed against a tumor-specific, exon 9 deleted (d9) E-cadherin adhesion protein. *Radiat Res* 2003;159:612–20.
142. Beyer GJ, Miederer M, Vranjes-Duric S, et al. Targeted alpha therapy in vivo: direct evidence for single cancer cell kill using <sup>149</sup>Tb-rituximab. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;31:547–54.

### **8.3 Article 3**

## Mechanisms of Cell Sensitization to $\alpha$ Radioimmunotherapy by Doxorubicin or Paclitaxel in Multiple Myeloma Cell Lines

Stephane Supiot,<sup>1,2</sup> Sebastien Gouard,<sup>1</sup> Josiane Charrier,<sup>2</sup> Christos Apostolidis,<sup>3</sup> Jean-Francois Chatal,<sup>1,2</sup> Jacques Barbet,<sup>1</sup> and Michel Cheral<sup>1,2</sup>

**Abstract Purpose:** The purpose of this study was to analyze different mechanisms (cell cycle synchronization, DNA damage, and apoptosis) that might underlie potential synergy between chemotherapy (paclitaxel or doxorubicin) and radioimmunotherapy with  $\alpha$  radionuclides.

**Experimental Design:** Three multiple myeloma cell lines (LP1, RPMI 8226, and U266) were treated with <sup>213</sup>Bi-radiolabeled B-B4, a monoclonal antibody that recognizes syndecan-1 (CD138) 24 hours after paclitaxel (1 nmol/L) or doxorubicin (10 nmol/L) treatment. Cell survival was assessed using a clonogenic survival assay. Cell cycle modifications were assessed by propidium iodide staining and DNA strand breaks by the comet assay. Level of apoptosis was determined by Apo 2.7 staining.

**Results:** Radiation enhancement ratio showed that paclitaxel and doxorubicin were synergistic with  $\alpha$  radioimmunotherapy. After a 24-hour incubation, paclitaxel and doxorubicin arrested all cell lines in the G<sub>2</sub>-M phase of the cell cycle. Doxorubicin combined with  $\alpha$  radioimmunotherapy increased tail DNA in the RPMI 8226 cell line but not the LP1 or U266 cell lines compared with doxorubicin alone or  $\alpha$  radioimmunotherapy alone. Neither doxorubicin nor paclitaxel combined with  $\alpha$  radioimmunotherapy increased the level of apoptosis induced by either drug alone or  $\alpha$  radioimmunotherapy alone.

**Conclusion:** Both cell cycle arrest in the G<sub>2</sub>-M phase and an increase in DNA double-strand breaks could lead to radiosensitization of cells by doxorubicin or paclitaxel, but apoptosis would not be involved in radiosensitization mechanisms.

$\alpha$ -Emitting radioisotopes might be more effective for metabolic radiotherapy than other radionuclides because of their high linear energy transfer and short pathways and because they can target radiation to individual cancer cells (1) and micrometastases (2). Early results with  $\alpha$  radioimmunotherapy have been encouraging (1). Like other radionuclides, they could be combined with chemotherapeutic drugs as this strategy has a strong biological rationale (3). However, up to now, most studies have considered combining drugs with X-rays or  $\gamma$ -rays, and radiosensitizing of cells by paclitaxel to  $\gamma$ -rays or X-rays (4, 5) has been attributed to three mechanisms: interactions with the cell cycle, apoptosis, and tumor hypoxia (6), those of doxorubicin to induction of DNA damage (7, 8) and tumor hypoxia (9). Paclitaxel does not induce DNA damage but promotes microtubule polymerization (10). Our

preliminary investigations on three myeloma cell lines (LP1, RPMI 8226, and U266) have shown that doxorubicin or paclitaxel combined with  $\alpha$  radioimmunotherapy is more effective than drug alone or  $\alpha$  radioimmunotherapy alone. In accordance with results obtained with other forms of radiation (6), the effect was stronger when  $\alpha$  radioimmunotherapy was given 24 hours after doxorubicin or paclitaxel. Experiments are in progress to formally show synergy between  $\alpha$  radioimmunotherapy and these drugs.

We have investigated several mechanisms that might give rise to synergy between paclitaxel or doxorubicin and  $\alpha$  radioimmunotherapy. We studied cell cycle arrest in the G<sub>2</sub>-M phase, DNA strand breaks, and apoptosis in the three multiple myeloma cell lines pretreated or not with doxorubicin or paclitaxel and exposed during 12 hours to  $\alpha$  radioimmunotherapy using the anti-syndecan-1 (CD138) antibody B-B4 labeled with bismuth-213 (<sup>213</sup>Bi).

### Materials and Methods

**Human myeloma cell lines.** The human myeloma cell lines, RPMI 8226 and U266, were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD), and LP1 was obtained from DSMZ (Braunschweig, Germany). These cell lines were cultured in RPMI 1640 (Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgium) supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Biomedica, Boussens, France) and 2 mmol/L l-glutamine, at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and 100% humidity. Cells were transferred into fresh culture medium, and cell concentration was adjusted to 5 × 10<sup>5</sup> cells/mL, 48 hours before each assay.

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale U601, Moncoussu, Nantes, France; <sup>2</sup>Centre René Gauducheau, Nantes-St. Herblain, France; and <sup>3</sup>Transuranium Institute, Karlsruhe, Germany  
**Grant support:** Association pour la Recherche sur le Cancer and Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale, "poste-accueil" (S. Supiot). Presented at the Tenth Conference on Cancer Therapy with Antibodies and Immunocombinates, October 21 to 23, 2004, Princeton, New Jersey.  
**Requests for reprints:** Michel Cheral, Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale U601, 9 quai Moncoussu, 44093 Nantes, France. Phone: 33-2-4008-4747; Fax: 33-3-4035-6697; E-mail: Michel.Cheral@univ-nantes.fr.  
 © 2005 American Association for Cancer Research.  
 doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0021

Q3

**Monoclonal antibodies.** B-B4 monoclonal antibody (mAb), a murine IgG that recognizes syndecan-1 (CD 138) antigen, was kindly provided by Dr. John Wijdenes (Diaclone Research, Besançon, France; ref. 12). A sample of this antibody (50 mg/g) was allowed to react with twice-crystallized pepsin (Sigma, St. Louis, MO) for 2 hours at 37°C. The mixture was fractionated by exclusion-diffusion on a Superdex G200 column (Pharmacia, Guyancourt, France) equilibrated with 100 nmol/L phosphate buffer to obtain F(ab')<sub>2</sub> fragments for use in all experiments at a 2 nmol/L concentration.

**Monoclonal antibody labeling.** The <sup>213</sup>Bi generator was kindly provided by the TransUranium Institute (Karlsruhe, Germany). <sup>213</sup>Bi was selectively eluted by 2 mL of a solution containing 0.1 mol/L HCl and 0.1 mol/L NaI. B-B4 antibody was conjugated to the bifunctional chelating agent cyclohexyldiethylenetriaminopentaacetic acid, synthesized in our laboratory, as described by Brechbiel et al. (13). The antibody was incubated with 50 eq (mol/mol) cyclohexyldiethylenetriaminopentaacetic acid in HEPES buffer (0.1 mol/L, pH 8), and after overnight incubation at room temperature, purified by high-performance liquid chromatography on a Sephadex G200 gel-filtration column (Amersham Biosciences, Saclay, France). Mean chelate number per antibody, as assessed with 4 eq of buffered citrate-acetate (0.02-0.15 mol/L, pH 5.5) <sup>111</sup>In solution, was 2. B-B4 immunoreactivity, determined as described by Lindmo et al. (14), was modified only slightly by addition of chelate (>90%). A 10- to 100- $\mu$ g sample of B-B4-cyclohexyldiethylenetriaminopentaacetic acid was incubated in a solution of freshly eluted <sup>213</sup>Bi, for 15 minutes at 37°C, as described by Kaspersen et al. (15). The specific activity of the radiolabeled antibody was 150 MBq/mg. Radiochemical purity, checked by instant TLC-SG using 10% TCA as solvent, was >90%.

**Drugs.** Doxorubicin was purchased from Pharmacia and prepared extemporaneously in 9% NaCl. Paclitaxel was purchased from Bristol-Myers Squibb (Puteaux, France). Both drugs were diluted in culture medium to the desired final concentration. Drug concentrations leading to ~50% cell survival were chosen (10 and 1 nmol/L for doxorubicin and paclitaxel, respectively).

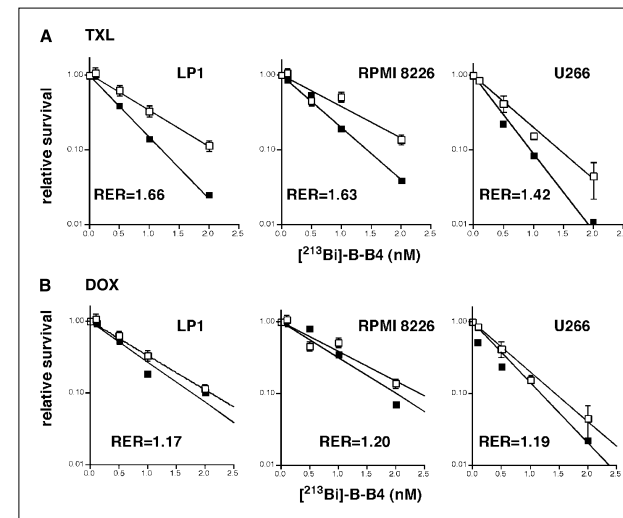
**Clonogenic survival assays.** Cell survival was assessed using the limiting dilution method. After treatment with drug followed by  $\alpha$  radioimmunotherapy 24 hours after, the cells were incubated at 37°C for 24 hours. They were then washed with fresh medium, diluted, and plated in 48 replicates in 96-well round-bottomed plates at concentrations of 1,000, 333, 111, 37, 12, 4, 1, and 0.5 cells per well. Each replicate was assayed for clonogenic growth by macroscopic and microscopic observation. A positive score was given only to replicates containing colonies of >64 cells. The best-fit survival curve was generated according to an exponential decreasing survival model and the mean inactivation dose (MID, area under survival curve) was calculated. The radiation enhancement ratio (RER) was defined as RER = MID  $\alpha$  radioimmunotherapy / MID drug +  $\alpha$  radioimmunotherapy. A RER value of >1 is indicative of radiosensitization. Survival curves for combined treatment were corrected for drug-induced cytotoxicity.

**Measurement of cell cycle distribution.** Cells (1 × 10<sup>6</sup>) were pelleted, resuspended in 0.2 mL PBS, and fixed by addition of 2 mL of ice-cold 70% ethanol/30% PBS. Fixed cells were pelleted, vigorously suspended in PBS, and incubated for 30 minutes at 37°C with 100  $\mu$ g/ml RNase A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and 40  $\mu$ g propidium iodide (Sigma-Aldrich). The fluorescence of the stained cells was analyzed using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA). Data were analyzed with ModFit LT2 (Becton Dickinson).

**Detection of apoptosis by Apo 2.7 staining.** The percentage of apoptotic cells was determined by flow cytometry using Apo 2.7 mAb as described by Koester et al. (16). Cells (2.5 × 10<sup>5</sup>) were incubated at 4°C for 20 minutes with Apo 2.7 mAb (Immunotech, Marseilles, France) in PBS for simple staining and then washed and fixed in PBS 1% formaldehyde. Flow cytometry analysis was done using a FACScan and the CELLQuest program (Becton Dickinson).

**Single-cell gel electrophoresis.** We used the protocol of Alapetite et al. (17) with minor modifications. After mild trypsination, a suspension of tumor cells was mixed with low melting point agarose held at 37°C to obtain a final concentration of 0.5% agarose and 5 × 10<sup>4</sup> cells/mL. The

Q4



**Fig. 1.** Relative survival after treatment with  $\alpha$  radioimmunotherapy ( $\alpha$ RIT) combined with 1 nmol/L paclitaxel (A) or 10 nmol/L doxorubicin (B). Specific activity of <sup>213</sup>Bi-cyclohexyldiethylenetriaminopentaacetic acid (CHX-DTPA)-B-B4: 96 MBq/mg for LP1, 150 MBq/mg for RPMI 8226, and 120 MBq/mg (paclitaxel, TXL) or 150 MBq/mg (doxorubicin, DOX) for U266. □,  $\alpha$  radioimmunotherapy; ■, drug +  $\alpha$  radioimmunotherapy. Survival curves for combined treatment have been corrected for drug-induced cytotoxicity. Means of at least two experiments; bars, SE.

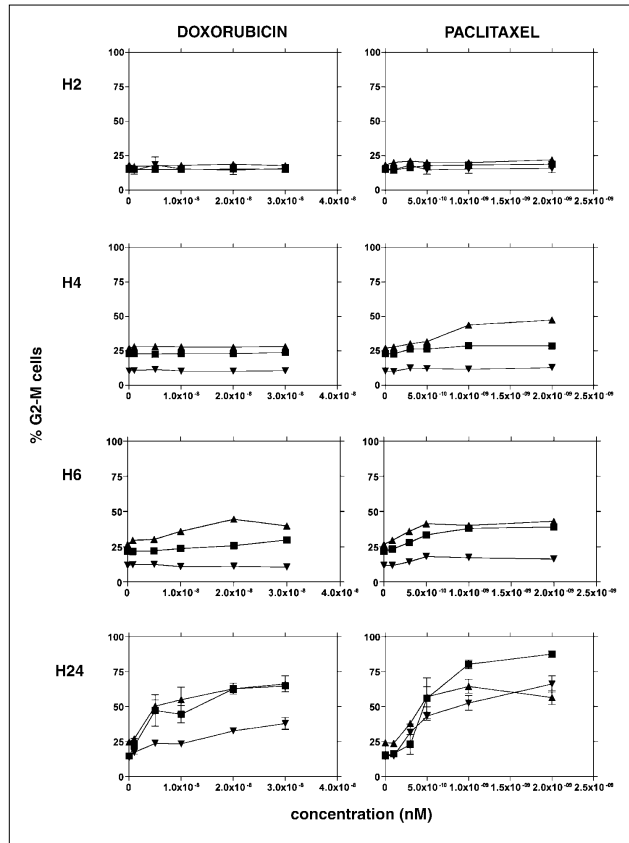


Fig. 2. Cell synchronization by drug treatment. The proportion of cells arrested in the G<sub>2</sub>-M phase of the cell cycle after doxorubicin and paclitaxel treatment at different incubation times is shown as a function of concentration for the three multiple myeloma cell lines. Square, LP1; triangle, RPMI 8226; open circle, U266.

suspension (170  $\mu$ L) was spread on a frosted microscope slide precoated with a layer of 200  $\mu$ L of normal melting point agarose. DNA damage was determined 12 hours after irradiation (36 hours after drug addition). The slides coated with agarose-embedded tumor cells were immersed for 1 hour in a cold lysis solution [2.5 mol/L NaCl, 100 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris, 1% N-lauryl sarcosine, 1% Triton X-100, 10% DMSO (pH 10, 4°C)] then removed and transferred for 40 minutes into fresh alkaline buffer [300 mmol/L NaOH, 1 mmol/L EDTA (pH 13)]. They were then transferred to a gel box containing the same buffer for horizontal electrophoresis (20 minutes at 25 V and 300 mA). After which, they were rinsed twice for 5 minutes with neutralization buffer (0.4 mol/L Tris, pH 7.5), stained with 65  $\mu$ L ethidium bromide (8 ng/ $\mu$ L), covered with a glass, and left for 30 minutes in the dark at 4°C. During all these steps, they were screened from direct sunlight. The slides were examined with an epifluorescence microscope (Leica). Comets were randomly captured at a constant gel depth and away from the edge of the gel. Superimposed comets

were avoided. The fluorescence image of each captured comet was acquired with a digital camera KP-M1 (Hitachi, Tokyo, Japan) and analyzed with image analysis software (Komet version 4.0 from Kinetic Imaging). The tail DNA content of the comets was assessed and compared with control. In each experiment, 25 comets per drug concentration were analyzed.

**Statistical analysis.** All values are reported as means  $\pm$  SE. Data were analyzed using the Student's *t* test or the Mann-Whitney rank sum test (SIGMASTAT software, Jandel Scientific). The significance level was set at *P* < 0.05.

**Results**

**Combined treatment of myeloma cells with  $\alpha$  radioimmunotherapy and paclitaxel or doxorubicin.** Drugs were added to cells at time 0. Radiolabeled antibody was added 24 hours later.

F1 Cells were incubated with drugs for 34 hours. The 12-hour incubation time is sufficient for complete <sup>213</sup>Bi decay (15 periods). As shown in Fig. 1, paclitaxel and  $\alpha$  radioimmunotherapy (Fig. 1A) synergized strongly in all three cell lines. A 48-hour incubation with 1 nmol/L paclitaxel gives RER values of 1.66, 1.63, and 1.42, for LP1, RPMI 8226, and U266 cells, respectively. Doxorubicin and  $\alpha$  radioimmunotherapy (Fig. 1B) synergized moderately in all three cell lines. With 10 nmol/L doxorubicin, survival curves gives a RER value of 1.17 for LP1, 1.20 for RPMI 8226, and 1.19 for U266 cells.

F2 **Cell cycle arrest by paclitaxel and doxorubicin.** As shown in Fig. 2, even low paclitaxel concentrations induced a major redistribution of the cell cycle. All three multiple myeloma cell lines were arrested in the G<sub>2</sub>-M phase when incubated with increasing concentrations of paclitaxel. The percentage of cells arrested increased with time but U266 cells remained unaffected until 6 hours of incubation. After 24 hours, >50% of cells were arrested in all three cell lines.

Cell arrest in the G<sub>2</sub>-M phase was slower with doxorubicin than with paclitaxel. Arrest of LP1 and RPMI 8226 cells did not occur before 6 hours of incubation. After 24 hours of incubation, all three cell lines were arrested. As for paclitaxel, the percentage of cells arrested at 24 hours was higher for RPMI 8226 and LP1 than for U266.

**Doxorubicin-induced DNA damage.** Cell response to potential strand-breaking agents was determined by the alkaline single-cell gel electrophoresis assay (or comet assay). Interrupted DNA strands of agarose-embedded cells may, after lysis and electrophoresis, migrate out of the nucleus toward the anode, forming a comet tail that can be visualized with a fluorescent DNA binding dye. The tail is related to the number of DNA breaks in the cells. Incubation of cells with <sup>213</sup>Bi-cyclohexyldiethylenetriaminepentaacetic acid-B-B4 induced DNA strand breaks in RPMI 8226 cells (relative tail DNA: 1.95  $\pm$  0.32, *P* = 0.01; Fig. 3). Incubation of cells with doxorubicin induced DNA strand breaks in RPMI 8226 cells

(1.30  $\pm$  0.25, *P* = 0.02). By contrast, no increase in DNA strand breaks was noted in LP1 or U266 cells, whether after incubation of  $\alpha$  radioimmunotherapy (1.15  $\pm$  0.35, 1.04  $\pm$  0.48, respectively) or doxorubicin (1.17  $\pm$  0.5, 0.78  $\pm$  0.29, respectively).

RPMI 8226 cells exposed to doxorubicin and then to  $\alpha$  radioimmunotherapy showed a higher number of DNA strand breaks (relative tail DNA: 2.86  $\pm$  0.3) than those exposed to doxorubicin alone (*P* = 0.028) or to  $\alpha$  radioimmunotherapy alone (*P* = 0.05). The number of strand breaks remained unchanged for LP1 cells (1.47  $\pm$  1.1) and U266 cells (1.15  $\pm$  0.6) exposed to doxorubicin and  $\alpha$  radioimmunotherapy.

**Apoptotic effects of paclitaxel or doxorubicin combined with  $\alpha$  radioimmunotherapy.** Apoptosis was monitored by fluorescence staining and flow cytometry with the antibody Apo2.7. The Apo 2.7 mAb recognizes 7A6, a 38-kDa antigen exposed on the outer mitochondrial membranes of cells undergoing apoptosis (18). 7A6 is detected on apoptotic cells, but not on normal-surface or digitonin-permeabilized cells. 7A6 antigen is revealed early during the apoptotic cascade before caspase-3 activation (19). Apo 2.7 mAb can discern apoptotic and incomplete apoptotic cells from necrotic cells (20) and has been used to quantify myeloma cell apoptosis in patients (21).  $\alpha$  Radioimmunotherapy induced apoptosis of LP1 cells (18% versus 8%, *P* < 0.001) and RPMI 8226 cells (27% versus 15%, *P* < 0.001) compared with controls (Fig. 4). By contrast, the level of apoptosis in  $\alpha$  radioimmunotherapy-treated U266 cells was not significantly different from that of controls (8% versus 6%, not significant). Paclitaxel induced significantly (*P* < 0.05) higher apoptosis levels (21%, 41%, and 15%) than doxorubicin (13%, 24%, and 8%) in LP1, RPMI 8226, and U266 cells, respectively. In U266 cells, paclitaxel doubled the number of apoptotic cells compared with controls (15% versus 6.2%, *P* = 0.015), whereas  $\alpha$  radioimmunotherapy or doxorubicin had no significant effect.

Although the apoptosis level was slightly higher after combined treatment (paclitaxel or doxorubicin +  $\alpha$  radioimmunotherapy) compared with treatment with paclitaxel (or doxorubicin) alone or  $\alpha$  radioimmunotherapy alone, this increase was not statistically significant.

**Discussion**

RER measured for the combination of  $\alpha$  radioimmunotherapy and paclitaxel or doxorubicin treatment clearly shows synergy. This synergy is especially strong with paclitaxel. This is similar to results obtained with external beam treatments or conventional radioimmunotherapy with  $\beta$ -emitting radionuclides. This observation may seem puzzling as  $\alpha$ -particles have been presented as capable of inducing unreparable DNA damage. However,  $\alpha$ -particles have also been shown to induce more subtle effects such as apoptosis, cell-cycle arrest, or bystander effects. Thus, complex mechanisms are involved in  $\alpha$ -particle irradiation that may be sensitive to radiosensitization. Experiments to formally show the synergy between paclitaxel or doxorubicin and  $\alpha$ -immunotherapy are in progress and will be published elsewhere.

Here we have investigated three mechanisms that might underlie the synergy observed between paclitaxel or doxorubicin

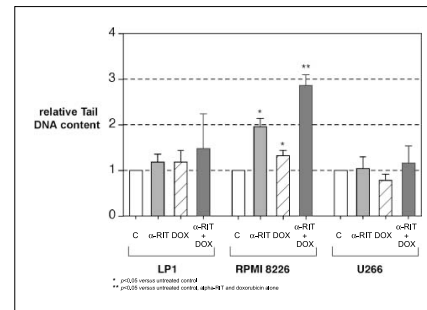


Fig. 3. Tail DNA content measured by the comet assay. Tail DNA content is given as a ratio compared with tail DNA content in untreated control cells. For all three cell lines, the bars correspond to C, untreated control;  $\alpha$ -RIT,  $\alpha$  radioimmunotherapy treatment with 2 nmol/L <sup>213</sup>Bi-cyclohexyldiethylenetriaminepentaacetic acid (CHX-A-DTPA)-B-B4 at a specific activity of 150 MBq/mg for 12 hours; DOX, treatment with 10 nmol/L doxorubicin for 36 hours;  $\alpha$  radioimmunotherapy + doxorubicin: treatment with doxorubicin for 36 hours and  $\alpha$  radioimmunotherapy (<sup>213</sup>Bi-CHX-A-DTPA-B-B4) during the last 12 hours.

Q5

Q6

Q7

Q8

Q9

F4

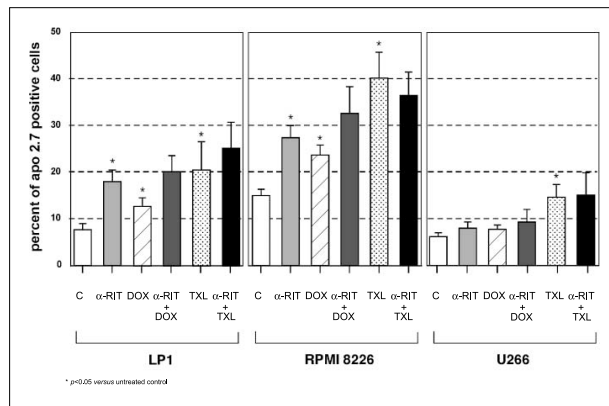
Q10

Q10

Q10



**Fig. 4.** Apoptosis after combined treatment. Apoptosis is given by the percentage of Apo 2.7<sup>+</sup> positive cells measured by fluorescence cytometry. For all three cell lines, the bars correspond to C, untreated control;  $\alpha$ -RIT,  $\alpha$  radioimmunotherapy treatment [2 nmol/L <sup>213</sup>Bi-cyclohexyldiethylenetriamipentacetate acid (CHX-A-DTPA)-B-B4 at a specific activity of 150 Mbq/mg] for 12 hours; DOX, treatment with doxorubicin for 36 hours;  $\alpha$  radioimmunotherapy + doxorubicin: treatment with doxorubicin for 36 hours and  $\alpha$  radioimmunotherapy (<sup>213</sup>Bi-CHX-A-DTPA-B-B4) during the last 12 hours; TXL, treatment with 1 nmol/L paclitaxel for 36 hours;  $\alpha$  radioimmunotherapy + paclitaxel, treatment with paclitaxel for 36 hours and  $\alpha$  radioimmunotherapy (<sup>213</sup>Bi-CHX-A-DTPA-B-B4) during the last 12 hours.



and  $\alpha$  radioimmunotherapy. We shall consider each of these mechanisms in turn.

Synchronized cells irradiated during the G<sub>2</sub>-M phase are more radiosensitive than cells irradiated in G<sub>1</sub> or S (22). Maximal radiosensitivity occurs during mitosis. The powerful arrest of cells in the radiosensitive G<sub>2</sub>-M phase of the cell cycle induced by taxanes is thought to account for the synergy between taxanes and  $\gamma$ -rays or X-rays (23–25). Paclitaxel or doxorubicin synchronized cells in the G<sub>2</sub>-M phase of the cell cycle in three multiple myeloma cell lines. G<sub>2</sub>-M arrest was faster with paclitaxel than with doxorubicin, but after 24 hours of incubation, the percentage of cells in G<sub>2</sub>-M was similar for 1 nmol/L paclitaxel and 10 nmol/L doxorubicin, except for U266 cells, which showed a lower percentage of cell-arrest than LP1 or RPMI 8226 cells. The observed cell cycle arrest in the G<sub>2</sub>-M phase may be an explanation for the increased cell killing efficacy of  $\alpha$ -immunotherapy given 24 hours after the initiation of drug treatment.

An increase in DNA strand breaks and impaired DNA repair have been invoked to explain synergy between drugs and ionizing radiation (26). Doxorubicin had an additive effect with  $\alpha$  radioimmunotherapy on induction of DNA damage in one of the three cell lines (RPMI 8226), as determined by the alkaline comet test, which measures both simple and double-strand breaks. This is in line with published observations on the synergy between doxorubicin and X-rays (8), which was attributed to residual DNA double-strand breaks (7). The comet assay thus probably measured mostly unrepaired DNA double-strand breaks. Doxorubicin or  $\alpha$  radioimmunotherapy or their combination did not induce a measurable increase in DNA strand breaks in U266 and LP1 cell lines. Reasons for this could be that cells killed by  $\alpha$  radioimmunotherapy disappear rapidly and those that survive are repaired before 24 hours. Unfortunately, measurement of DNA strand breaks at earlier time points are difficult to do because of technical constraints (delivery of the irradiation dose by the  $\alpha$ -emitting radioisotopes takes several hours).

Paclitaxel does not induce DNA damage. *In vivo* studies have suggested that its antitumor effects are due to apoptosis rather than to cell cycle modifications (27). Paclitaxel act on apoptosis by inducing phosphorylation of BCL2 (28, 29), particularly in multiple myeloma cell lines (30, 31). Doxorubicin also acts through apoptotic mechanisms (32). Because  $\alpha$  radioimmunotherapy increases the number of apoptotic multiple myeloma cells (33), apoptotic mechanisms could be related to the synergy between the drugs and  $\alpha$  radioimmunotherapy. However, our results do not support this hypothesis. Increased apoptosis was observed for LP1 and RPMI 8226 cells treated with  $\alpha$  radioimmunotherapy, doxorubicin, or paclitaxel. Apoptosis was also induced in U266 cells by paclitaxel but not by  $\alpha$  radioimmunotherapy or doxorubicin even at high drug concentrations (5 nmol/L, data not shown) or after long observation times (up to 72 hours, data not shown). However, neither paclitaxel nor doxorubicin significantly increased  $\alpha$  radioimmunotherapy-induced apoptosis in any cell line. Longer observation (up to 72 hours) did not reveal any significant difference between the three cell lines (data not shown).

In conclusion, synchronization in the G<sub>2</sub>-M phase seems the most prominent effect of drug treatment in the three myeloma cell lines. Such a synchronization has been described as the major course of synergy between chemotherapy and external beam irradiation, although radiosensitization may not be seen in some cell line (34). Thus, synchronization in the G<sub>2</sub>-M phase may also be the major cause of the observed synergy between paclitaxel and doxorubicin on  $\alpha$  radioimmunotherapy in myeloma cell lines. By contrast, DNA breaks increase is significant only in RPMI 8226 cells after combined doxorubicin and  $\alpha$  radioimmunotherapy treatment and apoptosis is not enhanced by combined treatment.

#### Acknowledgments

We thank Guy Blain (Subatech) for technical support.

#### References

- Jurcic JG, Larson SM, Sgouros G, et al. Targeted  $\alpha$ -particle immunotherapy for myeloid leukemia. *Blood* 2002;100:1233–9.
- Kennel SJ, Boll R, Stabin M, Schuller HM, Mirzadeh S. Radioimmunotherapy of micrometastases in lung with vascular targeted <sup>213</sup>Bi. *Br J Cancer* 1999;80:175–84.
- McDevitt MR, Ma D, Lai LT, et al. Tumor therapy with targeted atomic nanogenerators. *Science* 2001;294:1537–40.
- Milas L, Hunter NR, Mason KA, Kurdoglu B, Peters LJ. Enhancement of tumor radiosensitivity of a murine mammary carcinoma by paclitaxel. *Cancer Res* 1994;54:3506–10.
- Milas L, Saito Y, Hunter N, Milross CG, Mason KA. Therapeutic potential of paclitaxel-radiation treatment of a murine ovarian carcinoma. *Radiat Oncol* 1996;40:163–70.
- Milas L, Milas MM, Mason KA. Combination of taxanes with radiation: preclinical studies. *Semin Radiat Oncol* 1999;9:12–26.
- Bonner JA, Lawrence TS. Doxorubicin decreases the repair of radiation-induced DNA damage. *Int J Radiat Biol* 1990;57:55–64.
- Byfield JE, Lee YC, Tu L. Molecular interactions between Adriamycin and X-ray damage in mammalian tumor cells. *Int J Cancer* 1977;19:186–93.
- Durand RE, LePard NE. Tumour blood flow influences combined radiation and doxorubicin treatments. *Radiat Oncol* 1997;42:171–9.
- Schiff PB, Horwitz SB. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:1561–5.
- Suptoi S, Rio E, Gouard S, et al.  $\alpha$ -Radioimmunotherapy of multiple myeloma could be improved by concomitant chemotherapy. 4814. In: San Francisco, California: 93rd annual meeting of the American Association for Cancer Research; 2002 April 6–10, p. 972.
- Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C, et al. A plasmocytoselective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol* 1996;94:318–23.
- Brechbiel MW, Gansow OA. Synthesis of C-functionalized *trans*-cyclohexyldiethylenetriamipentacetate acid for labelling of monoclonal antibodies with the bismuth-212  $\alpha$ -particle emitter. *J Chem Soc Perkin Trans* 1992;1:1173–8.
- Lindmo T, Boven E, Cattivita F, Fedorko J, Bunn PA, Jr. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J Immunol Methods* 1984;72:77–89.
- Kaspersen FM, Bos E, Doormalen AV, Geerlings MW, Apostolidis C, Molinet R. Cytotoxicity of <sup>213</sup>Bi- and <sup>225</sup>Ac-immunoconjugates. *Nucl Med Commun* 1995;16:468–76.
- Koester SK, Roth P, Mikulka WR, Schlossman SF, Zhang C, Bolton WE. Monitoring early cellular responses in apoptosis is aided by the mitochondrial membrane protein-specific monoclonal antibody APO2.7. *Cytometry* 1997;29:306–12.
- Alapetite C, Wächter T, Sage E, Moustacchi E. Use of the alkaline comet assay to detect DNA repair deficiencies in human fibroblasts exposed to UVC, UVB, UVA and  $\gamma$ -rays. *Int J Radiat Biol* 1996;69:359–69.
- Zhang C, Ao Z, Seth A, Schlossman SF. A mitochondrial membrane protein defined by a novel monoclonal antibody is preferentially detected in apoptotic cells. *J Immunol* 1996;157:3980–7.
- Bussing A, Verweken W, Wagner M, Wagner B, Fuller U, Schietzel M. Expression of mitochondrial Apo2.7 molecules and caspase-3 activation in human lymphocytes treated with the ribosome-inhibiting mistletoe lectins and the cell membrane permeabilizing viscositoxins. *Cytometry* 1999;37:133–9.
- Koester SK, Schlossman SF, Zhang C, Decker SJ, Bolton WE. APO2.7 defines a shared apoptotic-mitochondrial pathway in a breast tumor hypoxia model. *Cytometry* 1998;33:324–32.
- Le Gouill S, Pellat-Deceunynck C, Harousseau JL, et al. Farnesyl transferase inhibitor R115777 induces apoptosis of human myeloma cells. *Leukemia* 2002;16:1664–7.
- Sinclair VK, Morton RA. X-ray sensitivity during the cell generation cycle of cultured Chinese hamster cells. *Radiat Res* 1966;29:450–74.
- Tishler RB, Schiff PB, Geard CR, Hall EJ. Taxol: a novel radiation sensitizer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992;22:613–7.
- Asosingh K, De Raeye H, Van Riet I, Van Camp B, Vanderkerken K. Multiple myeloma tumor progression in the 5T2MM murine model is a multistage and dynamic process of differentiation, proliferation, invasion, and apoptosis. *Blood* 2003;101:3136–41.
- Leonard CE, Chan DC, Chou TC, Kumar R, Bunn PA. Paclitaxel enhances *in vitro* radiosensitivity of squamous carcinoma cell lines of the head and neck. *Cancer Res* 1996;56:5198–204.
- Lawrence TS, Blackstock AW, McGinn C. The mechanism of action of radiosensitization of conventional chemotherapeutic agents. *Semin Radiat Oncol* 2003;13:13–21.
- Milross CG, Mason KA, Hunter NR, Chung WK, Peters LJ, Milas L. Relationship of mitotic arrest and apoptosis to antitumor effect of paclitaxel. *J Natl Cancer Inst* 1998;88:1308–14.
- Haldrup S, Chintapalli J, Croce CM. Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. *Cancer Res* 1996;56:1253–5.
- Haldrup S, Jena N, Croce CM. Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:4507–11.
- Kroning R, Lichtenstein A. Taxol can induce phosphorylation of BCL-2 in multiple myeloma cells and potentiates dexamethasone-induced apoptosis. *Leuk Res* 1998;22:275–86.
- Gazit Y, Rothenberg ML, Hilsenbeck SG, Fey V, Thomas C, Montegomery W. Bcl-2 overexpression is associated with resistance to paclitaxel, but not gemcitabine, in multiple myeloma cells. *Int J Oncol* 1998;13:839–48.
- Panaretakis T, Pokrovskaja K, Shoshan MC, Grandier D. Activation of Bak, Bax, and BH3-only proteins in the apoptotic response to doxorubicin. *J Biol Chem* 2002;277:4437–26.
- Couturier O, Favre-Chauvet A, Filipovich IV, et al. Validation of <sup>213</sup>Bi- $\alpha$  radioimmunotherapy for multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 1999;5:3165–70s.
- Liebmann J, Cook JA, Fisher J, Teague D, Mitchell JB. *In vitro* studies of Taxol as a radiation sensitizer in human tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:441–6.

## **8.4 Article 4**

En cours de soumission dans « Journal of Nuclear Medicine »

**Article title:**

SYNERGISM BETWEEN ALPHA-RADIOIMMUNOTHERAPY AND PACLITAXEL OR DOXORUBICIN IN HUMAN MYELOMA CELL-LINES

**Short title :**

Synergism between alpha-RIT and drugs in multiple myeloma

**Authors:**

Stephane Supiot<sup>1,2</sup>, Alain Faivre-Chauvet<sup>1</sup>, Francois Thillays<sup>1,2</sup>, Sebastien Gouard<sup>1</sup>, Emmanuel Rio<sup>2</sup>, Karine Bernardeau<sup>1</sup>, Marie Mouglin<sup>1</sup>, Christos Apostolidis<sup>3</sup>, Alfred Morgenstern<sup>3</sup>, John Wijdenes<sup>4</sup>, Jacques Barbet<sup>1</sup>, François Davodeau<sup>1</sup> and Michel Chérel<sup>1,2</sup>

1 - Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 601, Nantes, France

2 - Centre René Gauducheau, Nantes-St-Herblain, France

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

4 - Diaclone Research company, Besançon, France

**Corresponding author:**

Michel Chérel, Unité INSERM 601, 9 quai Moncousu, 44093 Nantes Cedex 1, France.  
Fax: (+33) 2 40 35 66 97, e-mail: mcherel@nantes.inserm.fr

**Key words**

Multiple myeloma, alpha radioimmunotherapy, paclitaxel, doxorubicin, synergism

**Journal category**

Research article; cancer therapy  
Chemotherapy drugs can synergize with alpha radioimmunotherapy. This finding provides a basis for clinical trials of combination treatments with alpha particles.

**ABSTRACT**

Alpha-radioimmunotherapy (alpha-RIT) with anti-CD138 B-B4 monoclonal antibody labeled with bismuth 213, an alpha particle emitter, affects the survival of human myeloma cells. We wondered whether combining alpha-RIT with a chemotherapy drug (paclitaxel, doxorubicin, dexamethasone or vinblastin) would induce synergism. The efficacy of the combinations was assessed on the proliferation of 3 human myeloma cell-lines (LP1, RPMI 8226, and U266) using the Chou-Talalay multiple-drug-effect equation. A Radiation Enhancement Ratio (RER) was also calculated for each combination from clonogenic survival curves. Our results showed that paclitaxel was highly synergistic with alpha-RIT, with a RER between 1.42 and 1.66. Doxorubicin induced an additive response with alpha-RIT after 2 hours incubation and a moderately synergistic response after 24 hours incubation, with a RER between 1.17 and 1.20. Dexamethasone and alpha-RIT showed an additive response. On the other hand, vinblastin and alpha-RIT tended to be mutually antagonistic. In conclusion, our findings provide a basis for combining paclitaxel or doxorubicin with alpha-RIT in clinical trials of multiple myeloma.

## INTRODUCTION

Multiple myeloma is characterized by the accumulation of monoclonal plasma cells in the bone marrow. Patients with multiple myeloma have a median life expectancy of only 3 years. For patients under 65, the standard treatment is intensive chemotherapy with autologous bone marrow transplantation. Although this treatment prolongs survival, it does not eliminate the risk of relapse, hence the need for new treatment modalities (1).

Radioimmunotherapy (RIT) using  $^{131}\text{I}$  or  $^{90}\text{Y}$ -labeled anti-CD20 antibody is an effective treatment of lymphoma(2). Alpha-emitting radionuclides, because of their high linear energy transfer (100 keV/ $\mu\text{m}$ ) and short pathlengths in tissue (70  $\mu\text{m}$ ) (3), have the potential to selectively kill single tumor cells or small tumor clusters(4), with minimal harm to adjacent tissues. They are 5 to 10 times more cytotoxic than the beta-particles of  $^{131}\text{I}$  or  $^{90}\text{Y}$  in current use in RIT clinical protocols (5,6).

A phase I study has validated the clinical feasibility of alpha-RIT with a humanized antibody directed against the CD33 antigen expressed on the cell surface of acute myeloid leukemia cells(7). In this study, however, the maximum tolerated dose was never reached and efficacy was limited probably because the tumor burden was high. Efficacy might be enhanced by increasing the specific activity of the radiolabeled antibody or by combining chemotherapy with alpha-RIT. The combination of chemotherapy with external beam radiation therapy has improved treatment outcomes for many solid tumors(8).

The aim of this study was to identify drugs that synergize with alpha-RIT. To target myeloma cells, we used B-B4, a murine antibody directed against the CD138 antigen (syndecan-1), because it is specific of these cells(9,10). B-B4 can be stably coupled to  $^{213}\text{Bi}$ , an alpha-particle emitter with a half life of 47 min, using CHX-A''-DTPA as chelating agent. The radiolabeled antibody ( $^{213}\text{Bi}$ -B-B4) arrests cells in the G2M phase of the cell-cycle, inducing apoptosis and decreased clonogenic survival(10,11). We studied alpha-RIT in combination with four drugs, either used in the treatment of multiple myeloma (doxorubicin, dexamethasone, vinblastin) or with known radiosensitizing properties (doxorubicin and paclitaxel), in three human myeloma cell-lines.

## MATERIALS AND METHODS

### Human myeloma cell-lines

The human myeloma cell-lines, RPMI 8226 and U266, were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA), and LP1 was obtained from DSMZ (Braunschweig, Germany). These cell-lines were cultured in RPMI 1640 (Biowhittaker Europe, Verviers, Belgium), supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Biomedica, Boussens, France) and 2 mM L-glutamine, at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and 100% humidity. Cells were transferred into fresh culture medium, and cell concentration was adjusted to  $5 \times 10^5$  cells/ml, 48 hours before each assay.

### Monoclonal antibody

B-B4 monoclonal antibody, a murine IgG that recognizes syndecan-1 (CD 138) antigen, was kindly provided by Dr. John Wijdenes(9) (Diaclone Research, Besançon, France). A sample of this antibody was allowed to react with twice-crystallized pepsin (50 mg/g) (Sigma) for 2 hr at 37°C. The mixture was fractionated by exclusion-diffusion on a Superdex G200 column (Pharmacia) equilibrated with 100 mM phosphate buffer pH 7,2 to obtain F(ab')<sub>2</sub> fragments for use in all experiments.

### Monoclonal antibody labeling

The  $\alpha$ -emitter  $^{213}\text{Bi}$  (T<sub>1/2</sub> = 46 min) was eluted from a  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$  generator system provided by the Institute for Transuranium Elements, Karlsruhe, Germany (described in (12)). A solution 2 ml of 0.1 M HCl/NaI was used to elute  $^{213}\text{Bi}$ , expected to be a  $\text{BiI}_5^{2-}$  anionic species (13). B-B4 antibody was conjugated to the bifunctional chelating agent CHX-A''-DTPA (cyclohexyldiethylenetriaminepenta-acetic acid), which was synthesized in our laboratory, as described by Brechbiel *et al*(14). B-B4-CHX-A''-DTPA (10-100  $\mu\text{g}$ ) was incubated in a buffered, calibrated solution of freshly eluted  $^{213}\text{Bi}$ , for 15 min at 37°C, as described by Kaspersen *et al.* (15). The specific activity (S.A.) of the radiolabeled antibody thus obtained was 75 -150 MBq/mg.

### Drugs

Doxorubicin was purchased from Pharmacia (Guyancourt, France) and vinblastin from Lilly (St-Cloud, France). Both were prepared extemporaneously in 0.9% NaCl. Dexamethasone was purchased from Qualimed (Puteaux, France) and paclitaxel from Bristol-Myers-Squibb (Puteaux, France). All drugs were diluted in culture medium to the desired final concentration.

### Measurement of cell proliferation

Drugs were added to cells at time zero. Radiolabeled antibody was added either 2 hours (protocol 1) or 24 hours (protocol 2) later. They were incubated with alpha-RIT and drugs for 12 hours (protocol 2) or 34 hours (protocol 1) at 37°C. The 12 hours incubation time is sufficient for complete  $^{213}\text{Bi}$  decay (15 periods). At 36 hours, cells were washed. To measure cell proliferation, the cells were resuspended in medium and plated in 96-well microtiter plates (Nunc) at 50  $\mu\text{l}$ /well. Cells were incubated with tritiated thymidine (Amersham Biosciences, 37 kBq/well), harvested 4 hours later and washed. Radioactivity uptake was counted in a liquid scintillation counter (1450 Microbeta Plus, Wallac, Finland).

The combination index (CI) was calculated using the Chou–Talalay equation, which takes into account the relative potency of each drug ( $D_m$ , the median-response dose, or  $\text{IC}_{50}$ , the concentration that inhibits cell proliferation by 50%) and the sigmoidal shape of the dose-response curve (the  $m$  value) (16). This method has been successfully used to assess synergism between paclitaxel and X-rays in squamous carcinoma cell-lines (17). A sigmoidal curve was then fitted to the thymidine uptake data. The general equation for a classic isobologram ( $\text{CI}=1$ ) is:

$$\text{CI} = (D)_1/(Dx)_1 + (D)_2/(Dx)_2 \quad (1)$$

where  $(Dx)_1$  and  $(Dx)_2$  are the concentrations of drug and alpha-RIT, respectively, that inhibit cell proliferation by  $x\%$  when they are used on their own, and  $(D)_1$  and  $(D)_2$  are the respective concentrations producing an  $x\%$  inhibition (i.e. isoeffectiveness) when they are used together. CI values of  $\text{CI} < 0.9$ ,  $0.9 \leq \text{CI} \leq 1.1$ , and  $\text{CI} > 1.1$  indicate synergism, additive effect, and antagonism, respectively.

In conservative non-mutually exclusive isobolograms assessing synergism between two agents, a third term, namely,  $(D)_1(D)_2/[(Dx)_1(Dx)_2]$ , is added to equation 1. However, it is often omitted (as in the results below) as agents are assumed to be mutually exclusive.

### Detection of apoptosis

The Apo 2.7 monoclonal antibody recognizes 7A6, a 38 kD antigen exposed on the outer mitochondrial membranes of cells undergoing apoptosis. 7A6 is detected on apoptotic cells, but not on normal-surface or digitonin-permeabilized cells. 7A6 antigen is revealed early during the apoptotic cascade, before caspase-3 activation. Apo 2.7 mAb (Immunotech, Marseille, France) can discern apoptotic and incomplete apoptotic cells from necrotic cells

and has been used to quantify myeloma cell apoptosis in patients. The percentage of apoptotic cells was determined by flow cytometry using Apo 2.7 mAb. Cells ( $2.5 \times 10^5$ ) were incubated at 4°C for 20 min with Apo 2.7 mAb in PBS for simple staining and then washed and fixed in PBS 1% formaldehyde. Flow cytometry analysis was performed using a FACScan and the CELLQuest program (Becton Dickinson) (18).

### Cell cycle analysis

Cells ( $1 \times 10^6$ ) were pelleted, resuspended in 0.2 ml PBS, and fixed by addition of 2 ml of ice-cold 70% ethanol / 30% PBS. Fixed cells were pelleted, vigorously suspended in PBS, and incubated for 30 min at 37°C with 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNase A (Sigma-Aldrich) and 40  $\mu\text{g}$  propidium iodide (Sigma-Aldrich). The fluorescence of the stained cells was analyzed in a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA). Data were analyzed with ModFit LT2 (Becton Dickinson).

### Clonogenic survival assays

Cell survival was assessed using the limiting dilution method. After treatment with drug and alpha-RIT, the cells were incubated at 37°C for 24 hours. They were then washed with fresh medium, diluted and plated in 48 replicates in 96-well round bottom plates at concentrations of 1000, 333, 111, 37, 12, 4, 1, and 0.5 cells per well. Each replicate was assayed for clonogenic growth by macroscopic and microscopic observation. A positive score was given only to replicates containing colonies of more than 64 cells. The best-fit survival curve was generated according to an exponential decreasing survival model and the mean inactivation dose (MID) (area under survival curve) was calculated (19). The radiation enhancement ratio (RER) was defined as:

$$\text{RER} = \text{MID alpha-RIT} / \text{MID drug} + \text{alpha-RIT} \quad (2)$$

A RER value greater than 1 is indicative of radiosensitization. Survival curves for combined treatment were corrected for drug-induced cytotoxicity.

## RESULTS

### Responses to alpha-RIT

To evaluate the effects of increasing concentrations of radiolabeled antibody in the 3 myeloma cell-lines, we measured cell proliferation, apoptosis and cell cycle after 48 hours incubation (Figure 1 A,B and C respectively). Cell proliferation was reduced in all cell-lines but much more so in LP1 or RPMI 8226 cells than in U266 cells. At a 14.8 MBq/l concentration of radiolabeled antibody (1nM), cell proliferation was down to 20% compared to only 60% for U266 cells. The numbers of apoptotic cells and of cells arrested in G2M showed dose dependent increase. The percentage of apoptotic cells was about 30% for RPMI 8226 cells and 20% for LP1 cells; it was very low for U266 cells. The percentage of cells arrested in G2M was 50% for RPMI 8226 cells and 20-25% for the two other cell-lines.

### Responses to drugs

Figure 2 and Table 1 give cell responses to the 4 drugs. The activity of both vinblastin and paclitaxel did not vary according to cell-line. Doxorubicin was less active in LP1 cells whereas dexamethasone was much more inhibitory in LP1 cells than in the other cell lines.

### Responses to combination treatment: drugs plus alpha-RIT

The drugs were used at concentrations around the  $IC_{50}$  value given in Table 1.

Paclitaxel and alpha-RIT synergized strongly in all three cell-lines, whether in protocol 1 (2 hours of pre-incubation with drug) or protocol 2 (24 hours of pre-incubation). Combination index (CI) values are given in Table 2. In protocol 1, CI values ranged from 0.39 to 0.82 for LP1 cells, from 0.31 to 0.95 for RPMI 8226 cells, and from 0.50 to 0.79 for U266 cells. In protocol 2, they ranged from 0.47 to 0.85 for LP1 cells, from 0.59 to 0.97 for RPMI 8226 cells, and from 0.46 to 0.72 for U266 cells. Cell survival is shown in Figure 3A. A 48-hour incubation with 1 nM paclitaxel (protocol 2) led to survival rates of 51% in LP1 cells, 65% in RPMI 8226 cells, and 59% in U266 cells. RER values were 1.66, 1.63, and 1.42, for LP1, RPMI 8226, and U266 cells, respectively.

Doxorubicin and alpha-RIT synergized moderately in all three cell-lines in protocol 2. CI values ranged from 0.58 to 0.81 for LP1 cells, from 0.58 to 0.73 for RPMI 8226 cells, and from 0.42 to 0.76 for U266 cells (Table 3). In protocol 1, the responses were merely additive. CI values ranged from 0.74 to 1.21 in LP1 cells, from 0.77 to 1.21 in RPMI 8226 cells, and

from 0.65 to 1.32 in U266 cells. Cell survival is shown in Figure 3B. In protocol 2, a 10 nM doxorubicin concentration led to approximately 60% cell death in all three cell-lines (survival rates of 45%, 30 % and 35% in LP1, RPMI 8226 and U266 cells, respectively). The corresponding RER values were 1.17, 1.20, and 1.19.

Dexamethasone plus alpha-RIT induced an additive, not synergistic, response in LP1 and U266 cells, and a somewhat mutually antagonist response in RPMI 8226 cells. In protocol 2, CI values ranged from 0.77 to 1.04 in LP1 cells, from 0.83 to 1.83 in RPMI 8226 cells, and from 0.87 to 1.05 in U266 cells (Table 4).

Vinblastin plus alpha-RIT gave rise to a mutually antagonist response in all three cell-lines with CI values close to or greater than 1. In protocol 1, CI values ranged from 0.82 to 2.42 in LP1 cells, from 0.94 to 2.77 in RPMI 8226 cells, and 0.73 to 2.42 in U266 cells (Table 5). In protocol 2, they ranged from 1.05 to 2.64 in LP1 cells, from 0.58 to 1.39 in RPMI 8226 cells, and from 0.77 to 2.41 in U266 cells.

## DISCUSSION

Combining drugs with alpha-RIT may be worthwhile provided that the drug acts via a mechanism that enhances the cell response to the radiolabeled antibody. In this study, targeting myeloma cells with alpha-RIT induced cell cycle arrest in G2M and apoptosis. These responses are well documented for gamma/X-rays (20) but not so well for alpha-particles. Responses to alpha-RIT differed according to the multiple myeloma cell-line and to the nature of the response measured. U266 cells were less sensitive to alpha-RIT than RPMI 8226 and LP1 cells, which had similar sensitivity. Alpha-RIT inhibited the growth of U266 cells least and induced the lowest level of apoptosis, but cell arrest in G2M was similar to that in LP1 cells. This variation in response to alpha-radiation was not an obstacle to combining drugs and alpha-RIT. The synergism we noted between alpha-RIT and paclitaxel or doxorubicin occurred whatever the initial sensitivity of the cell-line to alpha-RIT. Moreover, the drugs may present the advantage of overcoming any intrinsic radiation resistance as noted in U266 cells.

Of the 4 drugs tested in combination with alpha-RIT, paclitaxel and doxorubicin gave rise to synergistic responses, dexamethasone to additive responses, and vinblastin to a mutually antagonist response. The combination with paclitaxel was highly synergistic in all 3 cell-lines, even in the least radiosensitive line (U266). RER are similar to the results obtained when combining paclitaxel with either external beam radiotherapy in tumor cell-lines (for

review(21) or beta-RIT in murine models(22-24). The response to doxorubicin and alpha-RIT was synergistic in all three cell-lines after 24 hours pre-incubation but only additive after 2 hours pre-incubation. Synergism with beta-RIT has been reported for B lymphoma cell-lines (25) and in *in vivo* models of medullary thyroid carcinoma (26).

The mechanisms whereby these drugs interact with alpha-RIT have only been partially elucidated (18). It is difficult to determine the molecular basis of synergism between alpha RIT and drugs and each association need to be considered individually. Opposite effect in combination to alpha-RIT are observed for drugs like vinblastin and paclitaxel that act on the same cellular function. Both of them bind to tubulin and perturb microtubule dynamics (for review(27)). Tubulin has been implicated in the response to ionizing radiation(28) and apoptosis(29). However slight differences in their binding property and fine specificity for tubulin isoforms are sufficient to explain a protective or sensitizing effect to alpha RIT.

Confirmation of paclitaxel or doxorubicin synergism with alpha-RIT in *in vivo* murine models poses problems. Myeloma cell xenografts in SCID mice (30) are not a suitable *in vivo* model as they form macroscopic tumors that do not mimic the disseminated disease observed in human. Nor is the mouse myeloma 5T2 MM model (31) a suitable alternative as B-B4 does not bind to murine syndecan-1 (unpublished data).

The above findings suggest that either paclitaxel or doxorubicin could be combined with alpha-RIT in clinical trials in patients with multiple myeloma. Paclitaxel has some clinical activity against multiple myeloma (32) and has been included in an intensification regimen (33). However, it gave rise to severe non-hematological toxicity in 4 out of 14 patients in an ECOG study (34). In this study, paclitaxel synergized with alpha-RIT at low concentrations (1 nM) compatible with the drug plasma concentrations observed *in vivo* (35). Doxorubicin is currently used in conventional or intensive chemotherapy protocols and also synergized with alpha-RIT in our studies. Dexamethasone has no adverse clinical effects but would not enhance alpha-RIT toxicity. Its combination with alpha-RIT should not be rejected since Dexamethasone has show an additive effect whatever the initial sensitivity of the tumour cells. On the other hand, the combination of vinblastin and alpha-RIT seems contraindicated.

In conclusion, alpha-RIT is a potentially effective way of targeting and killing myeloma cells. In line with the move from whole body irradiation toward RIT, a drug-alpha-RIT combination could constitute a useful conditioning regimen prior to autologous bone marrow transplantation in Multiple Myeloma.

### Acknowledgements

The authors wish to thank M Guy Blain (Ecole des Mines, Nantes, France) for technical assistance. Stephane Supiot was supported by grants from the *Association pour la Recherche sur le Cancer* and INSERM. John Wijdenes is employed by a firm which manufactures a monoclonal antibody used in this study.

**Table 1. Inhibition of multiple myeloma cell proliferation**

	IC <sub>50</sub> concentrations (nM)		
	LP1 cells	RPMI 8226 cells	U 266 cells
Dexamethasone	11	5000	220 000
Doxorubicin	23	10	14
Paclitaxel	2.3	2.3	2.6
Vinblastin	0.07	0.07	0.09

**Table 2. Inhibition of cell proliferation by paclitaxel plus alpha-RIT**

	Paclitaxel (nM)	Combination index (CI)			
		<sup>213</sup> Bi-DTPA-B-B4			
		0.1 nM	0.2 nM	0.5 nM	1 nM
LP 1 cells					
- Protocol 1	0.75	0.82*	0.51	0.43	0.70
	1.00	0.7	0.45	0.39	0.65
	1.25	0.76	0.5	0.45	ND
- Protocol 2	0.75	0.85	0.84	ND	ND
	1.00	0.47	0.60	0.80	0.67
	1.25	0.57	0.54	ND	ND
	1.75	ND	ND	0.66	0.77
	3.00	ND	ND	0.72	0.75
RPMI 8226 cells					
- Protocol 1	0.60	ND	0.87	0.32	0.36
	1.00	ND	0.95	0.31	0.37
- Protocol 2	1.00	ND	0.70	0.70	0.68
	1.75	ND	0.84	0.76	0.69
	3.00	ND	0.97	0.61	0.59
U266 cells					
- Protocol 1	1.00	0.62	0.52	0.54	0.50
	1.25	0.76	0.54	0.66	ND
	1.75	ND	ND	0.79	0.56
- Protocol 2	1.00	0.46	0.59	0.57	0.49
	1.25	0.52	0.63	0.72	ND
	1.75	ND	ND	0.64	0.53
	3.00	ND	ND	0.64	0.58

ND, not determined; CI values of  $< 0.9$ ,  $0.9 \leq CI \leq 1.1$ , and  $CI > 1.1$  indicate synergism, additive effect, and antagonism, respectively.

\* Synergism in the mutually exclusive interaction and lack of synergism in the non-mutually exclusive interaction.



**Table 3. Inhibition of cell proliferation by doxorubicin plus alpha-RIT**

	Doxorubicin (nM)	Combination index (CI)		
		<sup>213</sup> Bi-DTPA-B-B4		
		0.1 nM	0.2 nM	0.4 nM
LP 1 cells				
- Protocol 1	10	1.08	1.00	0.94
	15	0.91	0.74	0.88*
	20	1.11	1.21	1.06
- Protocol 2	10	0.81	0.80	0.80
	15	0.66	0.58	0.68
	20	0.73	0.58	0.59
RPMI 8226 cells				
- Protocol 1	5	1.21	1.07	0.89*
	7.5	1.03	1.10	0.93
	10	0.77*	1.06	1.00
- Protocol 2	5	0.73	0.73	0.64
	7.5	0.65	0.64	0.58
	10	0.71	0.68	0.69
U266 cells				
- Protocol 1	5	1.32	0.65	0.86*
	7.5	1.24	0.81*	1.11
	10	0.74	0.69	0.88*
- Protocol 2	7.5	0.72	0.59	0.66
	10	0.56	0.44	0.42
	15	0.76	0.47	0.63

CI values of  $< 0.9$ ,  $0.9 \leq CI \leq 1.1$ , and  $CI > 1.1$  indicate synergism, additive effect, and antagonism, respectively.

\* Synergism in the mutually exclusive interaction and lack of synergism in the non-mutually exclusive interaction.

**Table 4. Inhibition of cell proliferation by dexamethasone plus alpha-RIT**

	Dexamethasone	Combination index (CI)		
		<sup>213</sup> Bi-DTPA-B-B4		
		0.1 nM	0.2 nM	0.4 nM
LP1 cells				
- Protocol 2	10 nM	0.79*	0.91	1.04
	15 nM	0.77*	0.81*	1.02
	20 nM	0.85*	0.85*	1.02
RPMI 8226 cells				
- Protocol 2	0.5 $\mu$ M	0.83*	1.08	1.06
	1 $\mu$ M	1.75	1.66	0.93
	1.5 $\mu$ M	1.83	1.21	0.96
U266 cells				
- Protocol 2	0.1 mM	0.96	0.88*	1.04
	0.2 mM	0.89*	0.87*	1.00
	0.4 mM	1.02	0.93	1.05

CI values of  $< 0.9$ ,  $0.9 \leq CI \leq 1.1$ , and  $CI > 1.1$  indicate synergism, additive effect, and antagonism, respectively.

\* Synergism in the mutually exclusive interaction and lack of synergism in the non-mutually exclusive interaction.

**Table 5. Inhibition of cell proliferation by vinblastin plus alpha-RIT**

	Vinblastin (nM)	Combination index (CI)		
		<sup>213</sup> Bi-CHX DTPA-B-B4		
		0.1 nM	0.2 nM	0.4 nM
LP 1 cells				
- Protocol 1	0.025	2.42	1.10	0.82*
	0.050	1.54	1.81	2.30
	0.100	1.13	1.28	1.26
	0.150	1.02	1.12	1.15
- Protocol 2	0.025	2.44	2.36	2.64
	0.035	1.05	1.38	1.40
	0.050	1.46	1.40	1.30
RPMI 8226 cells				
- Protocol 1	0.025	1.25	0.94	0.98
	0.035	1.17	1.04	1.00
	0.050	2.77	2.32	2.69
	0.100	1.40	1.60	1.74
- Protocol 2	0.025	0.88	0.78*	0.58
	0.050	1.39	1.27	0.94
U266 cells				
- Protocol 1	0.025	2.42	1.51	1.63
	0.035	0.98	0.73*	1.34
	0.050	1.12	1.37	2.11
	0.100	1.16	1.05	1.19
	0.150	1.72	1.39	1.94
- Protocol 2	0.025	2.41	2.09	1.78
	0.035	0.77*	1.32	1.51
	0.050	0.92	1.03	1.06

CI values of < 0.9, 0.9 ≤ CI ≤ 1.1, and CI > 1.1 indicate synergism, additive effect, and antagonism, respectively.

\* Synergism in the mutually exclusive interaction and lack of synergism in the non-mutually exclusive interaction.

**Figure legends**

FIGURE 1. Inhibition of cell proliferation (A), percentage of apoptotic cells (B) and cells arrested in G2M (C) after treatment with alpha-RIT.

Cells were treated for 48 hours with different concentrations of <sup>213</sup>Bi-B-B4 (S.A. 150 MBq/mg). They were harvested for determination of tritiated thymidine uptake (A). They were stained with APO2.7 (B) or fixed in ice-cold 70% ethanol / 30% PBS and stained with propidium iodide (C) before flow cytometry analysis. ■ LP1, ▲ RPMI 8226, ▼ U266. Results are the means of at least 3 experiments; bars, SEM.

FIGURE 2. Inhibition of cell proliferation after treatment with doxorubicin (DOX), dexamethasone (DXM), paclitaxel (TXL), or vinblastin (VBL)

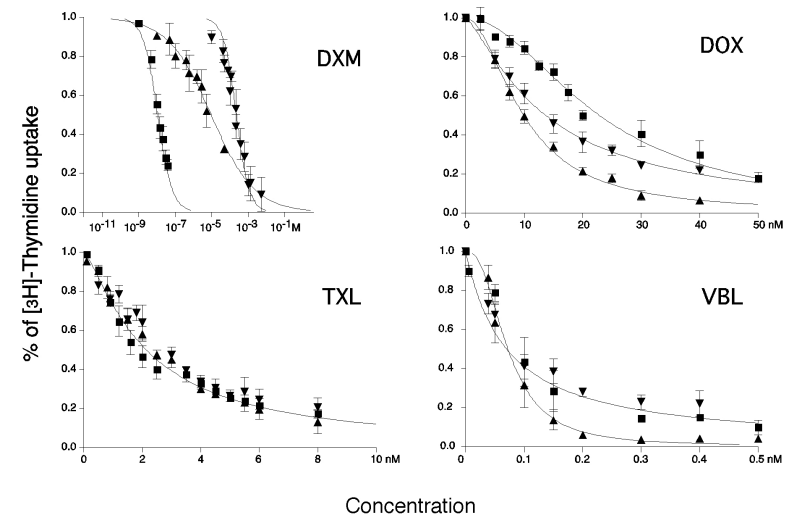
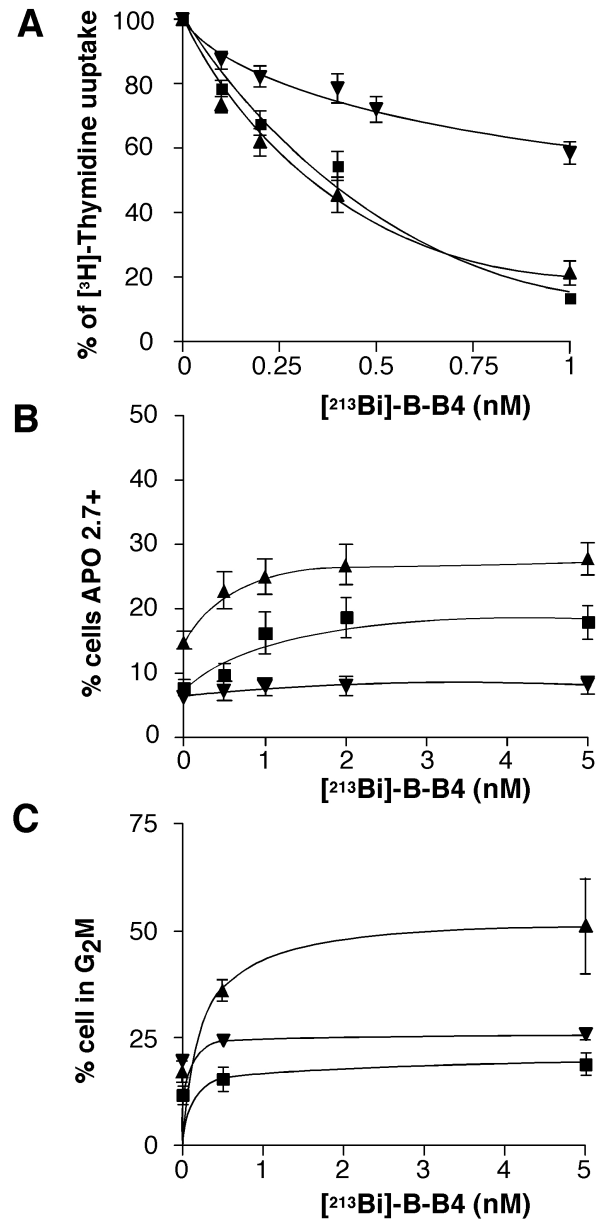
Cells were treated on day 1 with different concentrations of drugs. They were harvested on day 3 for determination of tritiated thymidine uptake. ■ LP1, ▲ RPMI 8226, ▼ U266. Curves were fitted to a sigmoidal dose-response curve. Results are the means of at least 3 experiments; bars, SEM.

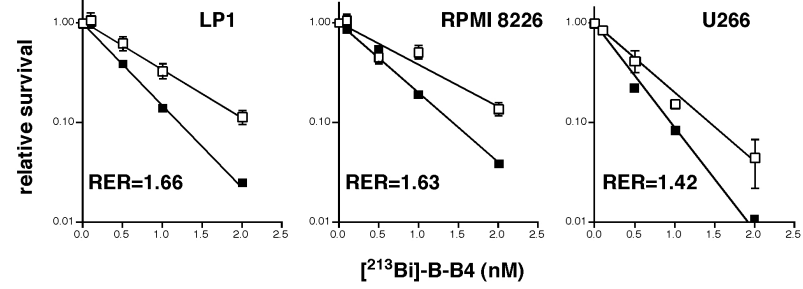
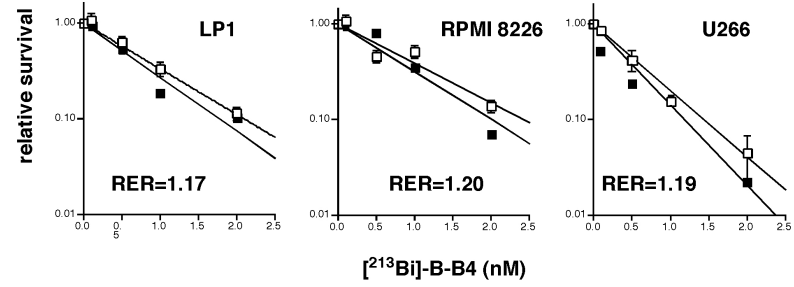
FIGURE 3. Relative survival after treatment with alpha-RIT combined with 1 nM paclitaxel (A) or 10 nM doxorubicin (B).

S.A. of <sup>213</sup>Bi-CHX DTPA-B-B4: 96 MBq/mg for LP1, 150 MBq/mg for RPMI 8226, and 120 MBq/mg (TXL) or 150 MBq/mg (DOX) for U266. □ alpha RIT, ■ drug + alpha. Survival curves for combined treatment have been corrected for drug-induced cytotoxicity. Results are the means of at least 2 experiments; bars, SEM.

1. Harousseau JL. Stem cell transplantation in multiple myeloma (0, 1, or 2). *Curr Opin Oncol*. Mar 2005;17(2):93-98.
2. Bethge WA, Sandmaier BM. Targeted cancer therapy and immunosuppression using radiolabeled monoclonal antibodies. *Semin Oncol*. Feb 2004;31(1):68-82.
3. Couturier O, Supiot S, Degraef-Mougouin M, et al. Cancer radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Apr 2005;32(5):601-614.
4. Nikula TK, McDevitt MR, Finn RD, et al. Alpha-emitting bismuth cyclohexylbenzyl DTPA constructs of recombinant humanized anti-CD33 antibodies: pharmacokinetics, bioactivity, toxicity and chemistry. *J Nucl Med*. Jan 1999;40(1):166-176.
5. McDevitt MR, Ma D, Lai LT, et al. Tumor therapy with targeted atomic nanogenerators. *Science*. Nov 2001;294(5546):1537-1540.
6. Macklis R, Kinsey B, Kassia A, et al. Radioimmunotherapy with alpha-particle-emitting immunoconjugates. *Science*. 1988;240(1024-1026).
7. Jurcic JG, Larson SM, Sgouros G, et al. Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. *Blood*. Aug 2002;100(4):1233-1239.
8. Calais G, Alfonsi M, Bardet E, et al. Randomized trial of radiation therapy versus concomitant chemotherapy and radiation therapy for advanced-stage oropharynx carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. Dec 1999;91(24):2081-2086.
9. Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C, et al. A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *British Journal of Haematology*. Aug 1996;94(2):318-323.
10. Supiot S, Faivre-Chauvet A, Couturier O, et al. Comparison of the biologic effects of MA5 and B-B4 monoclonal antibody labeled with iodine-131 and bismuth-213 on multiple myeloma. *Cancer*. Feb 2002;94(4 Suppl):1202-1209.
11. Couturier O, Faivre-Chauvet A, Filippovich IV, et al. Validation of 213Bi-alpha radioimmunotherapy for multiple myeloma. *Clinical Cancer Research*. Oct 1999;5(10 Suppl):3165s-3170s.
12. Apostolidis C, Carlos-Marquez R, Janssens W, et al. Cancer treatment using Bi-213 and Ac-225 in radioimmunotherapy. *Nucl. News*. 2001;44(13):29-33.
13. Spivakov BY, Stoyanov ES, Gribov LA, Zolotov YA. Raman laser spectroscopic studies of bismuth(III)halide complexes in aqueous solution. *J. Inorg. Nucl. Chem*. 1979;14:453-455.
14. Brechbiel MW, Gansow OA. Synthesis of C-Functionalized *trans*-Cyclohexyldiethylenetriaminepenta-acetic acid for Labelling of monoclonal antibodies with the bismuth-212 alpha-particle emitter. *J. Chem. Soc. Perkin Trans*. 1992;1:1173-1178.
15. Kaspersen FM, Bos E, Doornmalen AV, et al. Cytotoxicity of 213Bi- and 225Ac-immunoconjugates. *Nuclear Medicine Communications*. Jun 1995;16(6):468-476.
16. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*. 1984;22:27-55.
17. Leonard CE, Chan DC, Chou TC, Kumar R, Bunn PA. Paclitaxel enhances in vitro radiosensitivity of squamous carcinoma cell lines of the head and neck. *Cancer Research*. Nov 1996;56(22):5198-5204.
18. Supiot S, Gouard S, Charrier J, et al. Mechanisms of cell sensitization to alpha Radio Immuno Therapy by doxorubicin or paclitaxel in multiple myeloma cell lines. *Clin Cancer Res*. 2005;in press.
19. Fertil B, Dertinger H, Courdi A, Malaise EP. Mean inactivation dose: a useful concept for intercomparison of human cell survival curves. *Radiat Res*. 1984;99(1):73-84.

20. Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2004;59(4):928-942.
21. Milas L, Milas MM, Mason KA. Combination of taxanes with radiation: preclinical studies. *Semin Radiat Oncol*. Apr 1999;9(2 Suppl 1):12-26.
22. DeNardo SJ, Kukis DL, Kroger LA, et al. Synergy of Taxol and radioimmunotherapy with yttrium-90-labeled chimeric L6 antibody: efficacy and toxicity in breast cancer xenografts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(8):4000-4004.
23. Stein R, Juweid M, Zhang CH, Goldenberg DM. Assessment of combined radioimmunotherapy and chemotherapy for treatment of medullary thyroid cancer. *Clin Cancer Res*. 1999;5(10 Suppl):3199s-3206s.
24. Clarke K, Lee FT, Brechbiel MW, et al. Therapeutic efficacy of anti-Lewis(y) humanized 3S193 radioimmunotherapy in a breast cancer model: enhanced activity when combined with taxol chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2000;6(9):3621-3628.
25. Johnson TA, Press OW. Synergistic cytotoxicity of iodine-131-anti-CD20 monoclonal antibodies and chemotherapy for treatment of B-cell lymphomas. *Int J Cancer*. 2000;85(1):104-112.
26. Behr TM, Wulst E, Radetzky S, et al. Improved treatment of medullary thyroid cancer in a nude mouse model by combined radioimmunotherapy: doxorubicin potentiates the therapeutic efficacy of radiolabeled antibodies in a radioresistant tumor type. *Cancer Res*. 1997;57(23):5309-5319.
27. Jordan MA, Wilson L. Microtubule as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4:253-260.
28. Porter LA, Lee JM. alpha-, beta-, and gamma-Tubulin polymerization in response to DNA damage. *Exp Cell Res*. Nov 1 2001;270(2):151-158.
29. Carre M, Andre N, Carles G, et al. Tubulin is an inherent component of mitochondrial membranes that interacts with the voltage-dependent anion channel. *J Biol Chem*. Sep 13 2002;277(37):33664-33669.
30. Dingli D, Diaz RM, Bergert ER, et al. Genetically targeted radiotherapy for multiple myeloma. *Blood*. March 20, 2003 2003;2002-2011-3390.
31. Libouban H, Moreau MF, Baslé MF, Bataille FR, Chappard D. Selection of an highly aggressive myeloma cell line by an altered bone microenvironment in the C57BL/KaLwRij mouse. *Biochem Biophys. Res. Commun*. 2004;316:859-886.
32. Dimopoulos MA, Arbutck S, Huber M, et al. Primary therapy of multiple myeloma with paclitaxel (taxol). *Ann Oncol*. 1994;5(8):757-759.
33. Bilgrami S, Bona RD, Edwards RL, et al. Dexamethasone, paclitaxel, etoposide, cyclophosphamide (d-TEC) and G- CSF for stem cell mobilisation in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant*. 2001;28(2):137-143.
34. Miller HJ, Leong T, Khandekar JD, et al. Paclitaxel as the initial treatment of multiple myeloma: an Eastern Cooperative Oncology Group Study (E1A93). *Am J Clin Oncol*. 1998;21(6):553-556.
35. Huizing MT, Keung AC, Rosing H, et al. Pharmacokinetics of paclitaxel and metabolites in a randomized comparative study in platinum-pretreated ovarian cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*. Nov 1993;11(11):2127-2135.



**A TXL****B DOX**

## **8.5 Article 5**

En cours de soumission dans « International Journal of Radiation Oncology and Biophysics »

**GEMCITABINE SYNERGISM WITH LOW BUT NOT HIGH LINEAR ENERGY  
TRANSFER PARTICLES IN MULTIPLE MYELOMA CELLS**

STEPHANE SUPIOT, M.D.<sup>1,2</sup>, FRANCOIS THILLAYS, M.D.<sup>1,2</sup>, EMMANUEL RIO, M.D.<sup>1,2</sup>, SEBASTIEN  
GOUARD, M.D.<sup>1</sup>, MARC-ANDRE MAHE, M.D.<sup>1,2</sup>, JEAN-FRANÇOIS CHATAL, M.D.<sup>1,2</sup>, AND  
MICHEL CHEREL, M.D.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Medicale (INSERM), Unité 463, Nantes,  
France; <sup>2</sup>Centre René Gauducheau, Nantes-St-Herblain, France

Running title: Radiosensitization by gemcitabine

Conflicts of interest: no

Reprint requests and correspondence to:

Michel Chérel, M.D.  
Unité INSERM 463  
9 quai Moncoussu  
44093 Nantes Cedex 1, France.  
Fax: (+33) 2 40 35 66 97  
E-mail: mcherel@nantes.inserm.fr

## ABSTRACT

**Purpose:** To compare the radiosensitizing properties of gemcitabine in relation to low Linear Energy Transfer (LET) particles and high-LET particles.

**Methods and Materials:** We measured cell cycle distribution, clonogenic survival and apoptosis in 3 multiple myeloma cell lines (LP1, RPMI 8226, U266) after radiation treatment alone and after 24 h-preincubation with 10 nM gemcitabine followed by radiation treatment. For low-LET, we used gamma-rays (Cobalt 60; 0-4 Gy); for high-LET, we used alpha-RIT ( $^{213}\text{Bi}$ -radiolabeled CHX-DTPA-B-B4). Apoptosis was analyzed by apo 2.7 FACS staining.

**Results:** Gemcitabine acted synergistically with gamma-rays in LP1 and U266 cells with respect to both clonogenic survival (Radiation Enhancement Ratio: 1.55 and 1.49, respectively) and apoptosis. There was no synergy between gemcitabine and gamma rays in RPMI 8226 cells, and no synergy with alpha-RIT in any cell line. Gemcitabine plus alpha-RIT enhanced apoptosis compared to gemcitabine alone or alpha-RIT alone in U266 cells but not in LP1 or RPMI 8226 cells.

**Conclusion:** Gemcitabine enhanced the effects of low-LET but not high-LET particles in multiple myeloma cell lines. The effect depended on cell line. The difference in gemcitabine action with regard to type of radiation might be related to apoptotic mechanisms.

(192 words)

Keywords: Multiple myeloma, Ionizing radiation, Radiosensitizers, Gemcitabine ? (max = 5)

## INTRODUCTION

Gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine) is an effective treatment for many solid tumors, mainly non small-cell lung cancers, cancers of the bladder and of the pancreas. It is a potent ionizing radiation sensitizer *in vitro* and in preclinical studies. Encouraging tumor responses have been observed in clinical studies though associated with high toxicity in some cases (for review <sup>1</sup>).

The mechanisms of gemcitabine action are relatively well documented but those specifically related to its radiosensitizing action are unclear and still under study. Its cytotoxic and radiosensitizing properties depend on its intracellular phosphorylation into di- and triphosphate metabolites. Competition between the triphosphate and 2'-deoxycytidine 5'-triphosphate (dCTP) incorporation into DNA would be the main cause of its cytotoxicity <sup>2,3</sup>. The diphosphate is a potent inhibitor of ribonucleotide reductase, depleting the 2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate (dATP) pools in tumor cells and thus inhibiting DNA synthesis <sup>4, 5, Shewach, 1994 #48, Ostruszka, 2003 #148</sup>. There is a strong correlation between the radiosensitizing effects of gemcitabine *in vitro* and dATP depletion, but no relation with the triphosphate level or incorporation into DNA <sup>6-8</sup>.

Gemcitabine's radiosensitizing effects also appear to involve changes in cell cycle distribution and induction of apoptosis (for review <sup>9</sup>). They occur preferentially when cells accumulate in the S phase <sup>10-13</sup>. Since high linear energy transfer (LET) particles can overcome the radioresistance of cells in the S phase (Blakely, Ngo, Adv Radiat Biol, 1984), combining gemcitabine with high-LET particles might prove to have a highly synergistic lethal action on tumor cells <sup>13</sup>.

To test this hypothesis, we compared the effects of combining gemcitabine with radiation from low-LET particles ( $^{60}\text{Co}$  gamma rays) and high-LET particles (alpha particles emitted during alpha-radioimmunotherapy (RIT)) on clonogenic survival and apoptosis in three human multiple myeloma cell lines.

## METHODS AND MATERIALS

### **Drug**

Gemcitabine was purchased from Lilly France (St-Cloud, France) and diluted in culture medium to the desired final concentration.

### **Human myeloma cell lines**

The human myeloma cell lines, RPMI 8226 and U266, were obtained from the American



Type Culture Collection (Rockville, MD, USA), and LP1 was obtained from DSMZ (Braunschweig, Germany). These cell lines were cultured in RPMI 1640 (Biowhittaker Europe, Verviers, Belgium), supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Biomedica, Boussens, France) and 2 mM L-glutamine, at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and 100% humidity. Cells were transferred into fresh culture medium, and cell concentration was adjusted to 5 x 10<sup>5</sup> cells/ml, 48 h before each assay.

#### **Monoclonal antibodies**

B-B4 monoclonal antibody, a murine IgG that recognizes syndecan-1 (CD 138) antigen, was kindly provided by Dr. John Wijdenes (Diaclone Research, Besançon, France)<sup>14</sup>. A sample of this antibody (50 mg/g) was allowed to react with twice-crystallized pepsin (Sigma) for 2 h at 37°C. The mixture was fractionated by exclusion-diffusion on a Superdex G200 column (Pharmacia) equilibrated with 100 nM phosphate buffer to obtain F(ab')<sub>2</sub> fragments for use in all experiments at a 2 nM concentration.

#### **Monoclonal antibody labeling**

The <sup>213</sup>Bi generator was kindly provided by the TransUranium Institute (Karlsruhe, Germany). <sup>213</sup>Bi was selectively eluted by 2 ml of a solution containing 0.1 M HCl and 0.1 M NaI. B-B4 antibody was conjugated to the bifunctional chelating agent CHX-A''-DTPA (cyclohexyldiethylenetriaminepenta-acetic acid), synthesized in our laboratory, as described by Brechbiel *et al*<sup>15</sup>. The antibody was incubated with 50 eq (mol/mol) CHX-A''-DTPA in HEPES buffer (0.1 M, pH 8) and, after overnight incubation at room temperature, purified by HPLC on a Sephadex G200 gel-filtration column (Amersham Biosciences, Saclay, France). Mean chelate number per antibody was 2, as assessed with 4 eq of a buffered citrate-acetate (0.02-0.15 M, pH 5.5) <sup>111</sup>In solution. B-B4 immunoreactivity was modified only slightly by addition of chelate (>90%). A 10-100 µg sample of B-B4-CHX-A''-DTPA was incubated in a solution of freshly eluted <sup>213</sup>Bi for 15 min at 37°C. The specific activity of the radiolabeled antibody was 150 MBq/mg. Radiochemical purity, checked by ITLC-SG using 10% TCA as solvent, was >90%.

#### **Measurement of cell cycle distribution**

Cells (1x10<sup>6</sup>) were pelleted, resuspended in 0.2 ml PBS, and fixed by addition of 2 ml of ice-cold 70% ethanol/30% PBS. Fixed cells were pelleted, vigorously suspended in PBS, and incubated for 30 min at 37°C with 100 µg/ml RNase A (Sigma-Aldrich) and 40 µg propidium iodide (Sigma-Aldrich). The fluorescence of the stained cells was analyzed using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA). Data were analyzed with ModFit LT2 (Becton Dickinson).

#### **Proliferation assays**

Cells were resuspended in RPMI 1640 with 10% FCS at 10<sup>4</sup> cells/ml, and plated in 96-well microtiter plates (Nunc) at 50 µl/well. They were incubated for 12 or 36 h at 37°C before addition of <sup>3</sup>H-thymidine (Amersham Biosciences, 37 kBq/well), harvested 4 h later and washed. The amount of incorporated radioactivity was counted using a liquid scintillation counter (1450 Microbeta Plus, Wallac, Finland).

#### **Clonogenic survival assays**

Survival, *i.e.*, the ability of cells to maintain their clonogenic potential and form colonies, was assessed using the limiting dilution method<sup>16</sup>. After gemcitabine and radiation treatment, the cells were incubated at 37°C for 24 h. They were then washed with fresh medium, diluted and plated in 48 replicates in 96-well round bottom plates at concentrations of 1000, 333, 111, 37, 12, 4, 1, and 0.5 cells per well. Each replicate was assayed for clonogenic growth by macroscopic and microscopic observation. A positive score was given only to replicates containing colonies of more than 64 cells. The best-fit survival curve was generated according to an exponential decreasing survival model and the mean inactivation dose (MID) (area under survival curve) was calculated<sup>17</sup>. The radiation enhancement ratio (RER) was defined as: 
$$RER = MID [\text{radiation (alpha-RIT or gamma-rays)}] / MID [\text{gemcitabine + radiation}]$$
 A RER value greater than 1 is indicative of radiosensitization<sup>7</sup>. Survival curves for combined treatment were corrected for gemcitabine-induced cytotoxicity.

### ***Detection of apoptosis by Apo 2.7 staining***

The percentage of apoptotic cells was determined by flow cytometry using Apo 2.7 mAb as described by Koester *et al.*<sup>18</sup>. Cells ( $2.5 \times 10^5$ ) were incubated at 4°C for 20 min with Apo 2.7 mAb (Imultiple myelomaunotech, Marseille, France) in PBS for simple staining and then washed and fixed in PBS 1% formaldehyde. Flow cytometry analysis was performed using a FACSCan and the CELLQuest program (Becton Dickinson).

### ***Statistical analysis***

All values are reported as means  $\pm$  SEM. Data were analyzed using the Student's t-test or the Mann-Whitney rank sum test (SIGMASTAT software, Jandel Scientific). The significance level was set at  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

### ***Cell response to gemcitabine***

We measured three cell responses after 24-h incubation of the multiple myeloma cell lines with gemcitabine: proliferation, clonogenic survival and distribution (Table 1). There was no significant difference in response between the 3 cell lines with regard to proliferation (Fig. 1A) and clonogenic survival. Moreover, all 3 cell lines showed more than 70% cell arrest in the early S phase for gemcitabine concentrations in the 5 to 10 nM range (Fig. 1B).

### ***Radiosensitizing by gemcitabine***

Cell survival curves after gamma or alpha radiation, with or without gemcitabine pre-incubation, were compared (Fig. 2). There was a synergistic action between gemcitabine and gamma radiation in cell lines LP1 and U266; the RER values were comparable (1.55 and 1.49, respectively) (Fig. 2A). However, the RPMI cell line was not radiosensitized by gemcitabine. No enhancement by gemcitabine of the effects of alpha radiation was noted in any line (Fig. 2B). A reduced response was even observed in RPMI 8226 cells.

### ***Apoptosis***

We used radiation doses giving 3-5% clonogenic survival (i.e. 5 Gy for gamma radiation and 2 nM of  $^{213}\text{Bi-B-B4}$  with a specific activity of 4 mCi/mg for alpha radiation). A 10 nM gemcitabine concentration induced marked apoptosis in all 3 cell lines (Fig. 3). Alpha radiation induced significantly more apoptosis than gamma radiation in RPMI cells (29% vs 15%) but not in LP1 and U266 cells. LP1 cells exposed to both gemcitabine and gamma-rays showed a higher

rate of apoptosis (14.5%) than those exposed to gemcitabine alone (9.3%,  $p=0.011$ ) or to gamma-rays alone (8.9%,  $p=0.031$ ), as did U266 cells (12.2% vs 8.9% for gemcitabine alone ( $p=0.018$ ) and 7.1% for gamma-rays alone ( $p=0.032$ )). The combination gemcitabine plus gamma-rays did not affect apoptosis in RPMI 8226 cells. The combination gemcitabine plus alpha-RIT did not enhance apoptosis in any cell line.

## **DISCUSSION**

The above experiments investigated the ability of gemcitabine to modulate responses to low-LET ionizing radiation with  $^{60}\text{Co}$  gamma-rays and high-LET radiation with alpha-RIT. We found that gemcitabine could radiosensitize 2 multiple myeloma cell lines to the effects of gamma rays, but none of the cell lines to the effects of alpha particles.

The absence of radiosensitization to alpha particles could have several explanations amongst which: (i) cell cycle effects, (ii) apoptosis, (iii) DNA repair mechanisms, and (iv) signal transduction pathways.

(i) *Cell cycle effects.* Compared to cells in the  $G_0G_1$  or  $G_2M$  phase, cells in the S phase are radioresistant<sup>19</sup>. This radioresistance can be overcome more readily by heavy ions than by X-rays or gamma rays<sup>20</sup> and, according to Latz *et al.*, might be overcome even more readily if gemcitabine were combined with high-LET radiation since gemcitabine induces cell death mainly in the S phase<sup>13</sup>. Radiosensitization by gemcitabine has been linked to cell arrest in the early radiosensitive S phase; non-radiosensitized cell lines are arrested in the late S phase or in the G1 phase<sup>12,13</sup>. We therefore first investigated whether our 3 multiple myeloma cell lines were similarly arrested in the S phase after gemcitabine treatment. This proved to be the case. In addition, we showed that the cell death rate after gemcitabine treatment was not significantly different in the three cell lines. However, our results on the effects of the combined treatment on cell death did not confirm Latz *et al.*'s hypothesis insofar as enhancement by gemcitabine was observed with low-LET particles (gamma radiation) only and not with high-LET particles (alpha-RIT). In addition, the RPMI cell line was not radiosensitized by gemcitabine either in the case of gamma or alpha radiation.

(ii) *Apoptosis.* Gemcitabine induces apoptosis in many cell lines<sup>21-23</sup>. This is thought to contribute to its radiosensitizing action<sup>24</sup>. We therefore investigated gemcitabine and radiation-induced apoptosis. Gemcitabine enhanced apoptosis 1.5 to 2-fold above control in all 3 cell lines. Moreover, gemcitabine combined with gamma radiation enhanced apoptosis significantly further. This further enhancement, however, was observed only in LP1 and U266 cells and not in RPMI cells. These observations support the role of apoptosis in gamma radiosensitization and

also confirm that radiosensitization depends on cell line. On the other hand, no enhancement of apoptosis by gemcitabine was observed with alpha-RIT. Recently, gemcitabine has been shown to potentiate ceramide-mediated apoptosis in pancreatic cancer<sup>25</sup>. Ceramides are induced by low-LET radiation and their metabolism in cell lines sensitive to the combined effect of gemcitabine and radiotherapy would merit study.

(iii) *DNA repair mechanisms*. High-LET radiation leads to the formation of short DNA fragments (<1000 bp) caused by non-random double-strand breaks<sup>26,27</sup>. The number of double-strand breaks is increased in cells exposed to high-LET particles or ions<sup>28,29</sup>.

Moreover, these breaks are more complex and more slowly repaired than those due to low-LET radiation<sup>28,30</sup>. The main DNA repair pathway is nonhomologous end-joining (NHEJ)<sup>31</sup> but a functional NHEJ pathway is not required for gemcitabine-mediated radiosensitization<sup>32</sup>.

On the other hand, gemcitabine might induce radiosensitization by specific interference with homologous recombination-mediated repair<sup>33</sup> although our results suggest that this is not the main mechanism of DNA repair of damage due to high-LET radiation. ????

(iv) *Signal transduction pathways*. .....????

In conclusion, gemcitabine does not potentiate the effects of all kinds of ionizing radiation (alpha, beta and gamma/X). An explanation for this variability could be the difference in the induction of apoptosis which is higher when gemcitabine is combined with gamma rays than with alpha particles. Enhanced apoptosis might be due to a variety of molecular mechanisms.

## REFERENCES

## Figure legends

Fig. 1. Effect of gemcitabine on multiple myeloma cell line proliferation (A) and cell cycle (B). Proliferation is given by <sup>3</sup>H-thymidine uptake (curves were fitted by a sigmoid dose-response curve); cell cycle distribution is given by propidium iodide staining and FACS analysis. (Square: LP1, triangle: RPMI 8226, open circle: U266).

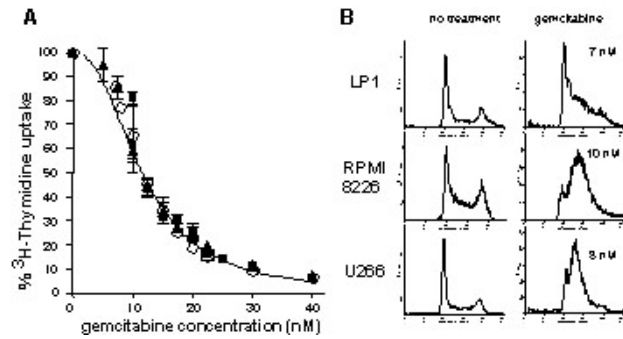
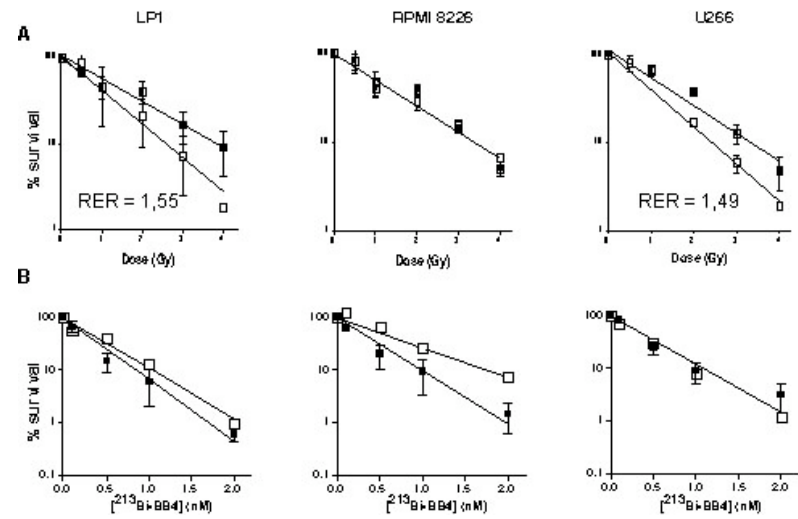
Fig. 2. Effects of gemcitabine (10 nM) combined with gamma rays (A) or alpha-RIT (B) on the clonogenic survival of 3 multiple myeloma cell lines. (Dark square: radiation alone, open square: gemcitabine (10 nM) followed by radiation 24 h later.)

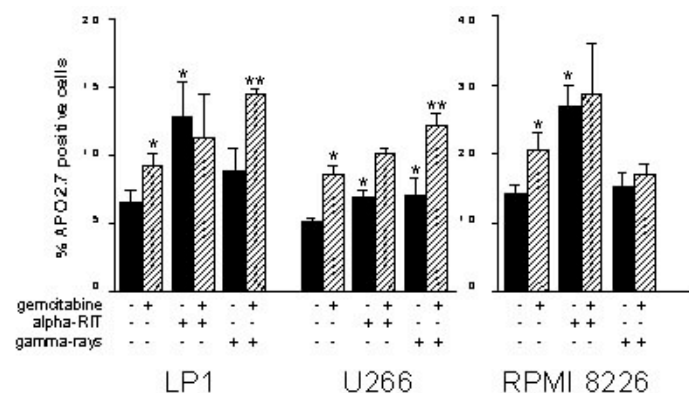
Fig. 3. Apoptosis after combined treatment. Apoptosis is given by the percentage of apo2.7 positive cells measured by fluorescence cytometry. Cells were incubated with 10 nM gemcitabine for 36 h. During the last 12 h of incubation, they were irradiated with alpha-RIT (2 nM <sup>213</sup>BI-CHX-A''-DTPA-B-B4 at a specific activity of 150 Mbq/mg) or 4 Gy <sup>60</sup>Co gamma-rays. (Note different scale for RPMI 8226 data). \* = significantly different from control; \*\* = significantly different from gemcitabine or gamma-rays alone.

Fig. 4. Relative Tail DNA after combined treatment. Tail DNA was measured by single cell gel electrophoresis. Gemcitabine (10 nM) for 27 h combined during the last 3 h with alpha-RIT (2 nM <sup>213</sup>BI-CHX-A''-DTPA-B-B4 at a specific activity of 150 Mbq/mg) or 4 Gy <sup>60</sup>Co gamma-rays. (Note different scale for RPMI 8226 data).

Table 1. Effects of gemcitabine (GMZ) on proliferation, clonogenic survival and cell distribution in three multiple myeloma cell lines

	LP1			RPMI 8226			U266					
	GMZ (nM)			GMZ (nM)			GMZ (nM)					
Proliferation (%)	10	62.0±8.8		10	60.5±4.9		10	54.2±5.9				
Clonogenic survival (%)	10	71.9±19.5		10	67.3±4.8		10	56.7±22				
Cell distribution pattern (%)		G1	S	G2M	G1	S	G2M	G1	S	G2M		
	0	48.5±3.5	38±1.4	13.5±2.1	0	32.5±0.7	49±2.8	18.5±2.1	0	48±5.7	39.5±6.4	12.5±0.7
	5	21.5±2.1	69.5±0.7	9±2.8	10	7±1.4	84.5±4.9	8.5±3.5	6	13±1.4	84±4.2	3±2.8
	6	20±5.7	69.5±7.8	10.5±2.1	15	7±1.4	88±2.8	5±1.4	7	10±1.4	84.5±0.7	5.5±0.7
	7	24.5±6.4	70.5±4.9	5±1.4	20	8.5±0.7	88±1.4	3.5±0.7	8	9.5±4.9	86.5±4.9	4±0.0





1. Pauwels B, Korst AE, Lardon F, *et al.* Combined modality therapy of gemcitabine and radiation. *Oncologist* 2005;10:34-51.
2. Huang P, Chubb S, Hertel LW, *et al.* Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res* 1991;51:6110-6117.
3. Schy WE, Hertel LW, Kroin JS, *et al.* Effect of a template-located 2',2'-difluorodeoxycytidine on the kinetics and fidelity of base insertion by Klenow (3'-->5'exonuclease-) fragment. *Cancer Res* 1993;53:4582-4587.
4. Heinemann V, Xu YZ, Chubb S, *et al.* Inhibition of ribonucleotide reduction in CCRF-CEM cells by 2',2'-difluorodeoxycytidine. *Mol Pharmacol* 1990;38:567-572.
5. Baker CH, Banzon J, Bollinger JM, *et al.* 2'-Deoxy-2'-methylencytidine and 2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine 5'-diphosphates: potent mechanism-based inhibitors of ribonucleotide reductase. *J Med Chem* 1991;34:1879-1884.
6. Lawrence TS, Chang EY, Hahn TM, *et al.* Delayed radiosensitization of human colon carcinoma cells after a brief exposure to 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine (Gemcitabine). *Clin Cancer Res* 1997;3:777-782.
7. Lawrence TS, Chang EY, Hahn TM, *et al.* Radiosensitization of pancreatic cancer cells by 2',2'-difluoro-2'- deoxycytidine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;34:867-872.
8. Shewach DS, Hahn TM, Chang E, *et al.* Metabolism of 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine and radiation sensitization of human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 1994;54:3218-3223.
9. Lawrence TS, Blackstock AW, McGinn C. The mechanism of action of radiosensitization of conventional chemotherapeutic agents. *Semin Radiat Oncol* 2003;13:13-21.
10. Pauwels B, Korst AE, de Pooter CM, *et al.* The radiosensitising effect of gemcitabine and the influence of the rescue agent amifostine in vitro. *Eur J Cancer* 2003;39:838-846.
11. Robinson BW, Shewach DS. Radiosensitization by gemcitabine in p53 wild-type and mutant MCF-7 breast carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res* 2001;7:2581-2589.
12. Ostruszka LJ, Shewach DS. The role of cell cycle progression in radiosensitization by 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine. *Cancer Research* 2000;60:6080-6088.
13. Latz D, Fleckenstein K, Eble M, *et al.* Radiosensitizing potential of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'- deoxycytidine) within the cell cycle in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;41:875-882.
14. Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C, *et al.* A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *British Journal of Haematology* 1996;94:318-323.
15. Brechbiel MW, Gansow OA. Synthesis of C-Functionalized *trans*-Cyclohexyldiethylenetriaminepenta-acetic acid for Labelling of monoclonal antibodies with the bismuth-212 alpha-particle emitter. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1992;1:1173-1178.
16. Taswell C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies. I. Data analysis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 1981;126:1614-1619.
17. Fertil B, Dertinger H, Courdi A, *et al.* Mean inactivation dose: a useful concept for intercomparison of human cell survival curves. *Radiat Res* 1984;99:73-84.
18. Koester SK, Roth P, Mikulka WR, *et al.* Monitoring early cellular responses in apoptosis is aided by the mitochondrial membrane protein-specific monoclonal antibody APO2.7. *Cytometry* 1997;29:306-312.
19. Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 2004;59:928-942.
20. Blakely EA, Ngo FQH, Curtis SB, *et al.* Heavy-ion radiobiology: Cellular studies. *Adv. Radiat. Biol.* 1984;11:pp. 295-389.
21. Tolis C, Peters GJ, Ferreira CG, *et al.* Cell cycle disturbances and apoptosis induced by topotecan and gemcitabine on human lung cancer cell lines. *Eur J Cancer* 1999;35:796-807.

22. Bouffard DY, Momparler RL. Comparison of the induction of apoptosis in human leukemic cell lines by 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) and cytosine arabinoside. *Leuk Res* 1995;19:849-856.
23. Huang P, Robertson LE, Wright S, *et al.* High molecular weight DNA fragmentation: a critical event in nucleoside analogue-induced apoptosis in leukemia cells. *Clin Cancer Res* 1995;1:1005-1013.
24. Lawrence TS, Davis MA, Hough A, *et al.* The role of apoptosis in 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine (gemcitabine)- mediated radiosensitization. *Clin Cancer Res* 2001;7:314-319.
25. Modrak DE, Cardillo TM, Newsome GA, *et al.* Synergistic interaction between sphingomyelin and gemcitabine potentiates ceramide-mediated apoptosis in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2004;64:8405-8410.
26. Lobrich M, Cooper PK, Rydberg B. Non-random distribution of DNA double-strand breaks induced by particle irradiation. *Int J Radiat Biol* 1996;70:493-503.
27. Høglund E, Blomquist E, Carlsson J, *et al.* DNA damage induced by radiation of different linear energy transfer: initial fragmentation. *Int J Radiat Biol* 2000;76:539-547.
28. Jenner TJ, deLara CM, O'Neill P, *et al.* Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in V79-4 mammalian cells following gamma- and alpha-irradiation. *Int J Radiat Biol* 1993;64:265-273.
29. Heilmann J, Taucher-Scholz G, Haberer T, *et al.* Measurement of intracellular dna double-strand break induction and rejoining along the track of carbon and neon particle beams in water. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;34:599-608.
30. Goodhead DT. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int J Radiat Biol* 1994;65:7-17.
31. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 2003;3:155-168.
32. van Putten JW, Groen HJM, Smid K, *et al.* End-joining deficiency and radiosensitization induced by gemcitabine. *Cancer Res* 2001;61:1585-1591.
33. Wachters FM, van Putten JW, Maring JG, *et al.* Selective targeting of homologous DNA recombination repair by gemcitabine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;57:553-562.

## **8.6 Protocole de phase I de radioimmunothérapie bêta du myélome multiple à l'aide de l'anticorps B-B4 marqué à l'iode 131**

## II RESUME DE L'ETUDE

Le myélome multiple est une prolifération maligne de plasmocytes monoclonaux dont la particulière gravité nécessite des approches thérapeutiques différentes de la chimiothérapie conventionnelle ou intensifiée.

C'est dans ce cadre que la radioimmunothérapie (RIT) peut représenter une avancée pour le traitement du myélome multiple. La RIT consiste à associer un anticorps spécifique des cellules tumorales ou de leur environnement avec un radioélément qui, en se désintégrant, va libérer l'énergie nécessaire pour détruire la cellule sur laquelle il est fixé. Nous avons développé la mise au point pré-clinique de la RIT du myélome multiple en utilisant l'anticorps B-B4 qui reconnaît l'antigène CD 138 présent à la surface de 100 % des cellules de myélome, couplé à l'iode 131 émetteur de particules bêta responsables de la destruction des cellules tumorales. Les résultats pré-cliniques ont conduit au développement d'une étude clinique de phase I chez des patients porteurs de myélome multiple réfractaires ou récidivants après trois lignes de traitement.

La première étape de ce protocole dite étape pré-thérapeutique étudiera la biodistribution et la pharmacocinétique d'une dose traceuse de l'anticorps radiomarqué. La deuxième étape dite étape thérapeutique étudiera la toxicité et les effets anti-tumoraux de l'anticorps B-B4 couplé à des doses croissantes d'iode 131. Il s'agit d'une étude avec bénéfice individuel direct puisqu'il est attendu une efficacité anti-tumorale du traitement. Le début de cette étude est prévue en 2005. 17 patients au minimum seront inclus pendant une durée estimée de 2 ans afin de déterminer la dose maximale tolérée et la dose limite toxique. Les effets secondaires immédiats, ainsi qu'à moyen et long termes seront analysés. Après détermination de la dose limite toxique, les patients seront traités à la dose maximale tolérée, pour un total de 15 patients à ce palier, ce qui permettra de mesurer la réponse tumorale objective au traitement. Ces patients seront suivis pendant 1 an après l'injection thérapeutique.

**Titre de l'étude :** « Etude clinique de phase I avec bénéfice individuel direct de radioimmunothérapie (RIT) du myélome multiple utilisant l'anticorps B-B4 marqué à l'iode 131 »

**Nombre de patients :** minimum 17 maximum envisagé 33  
**Durée de l'étude :** (3 ans) recrutement : 2 ans  
Suivi : 1 an

**Lieux de la recherche :** Service d'Hématologie – Hôtel-Dieu CHU de Nantes  
Services de Radiothérapie et de Médecine nucléaire -  
Centre René Gauducheau – Saint Herblain

## III JUSTIFICATION SCIENTIFIQUE ET MÉDICALE DE LA RIT

### 3.1 EPIDEMIOLOGIE DU MYELOME MULTIPLE

La fréquence du myélome multiple est comparable à celle des leucémies aiguës avec une incidence d'environ 2000 nouveaux cas par an en France. Le myélome multiple est à l'origine de 1 % des décès par cancer en France par an, et représente le dixième cancer en termes d'incidence. L'âge moyen de survenue du myélome est de 70 ans et sa fréquence tend à augmenter avec le vieillissement de la population<sup>1</sup>. Le myélome multiple pose ainsi un problème de santé publique par sa fréquence qui tend à augmenter et par la gravité de son pronostic pour la majorité des malades traités.

### 3.2 TRAITEMENT

La plupart des patients sont des sujets âgés de plus de 65 ans, pour lesquels le traitement de référence reste le protocole Alexanian, associant Melphalan et Prednisone qui permet d'obtenir chez des patients non traités antérieurement un taux de réponse d'environ 40%<sup>2</sup>. D'autres molécules comme le cyclophosphamide, les anthracyclines associées à la vincristine et à la dexaméthasone dans le protocole VAD, ou encore l'interféron alpha 2b ont permis d'obtenir de meilleurs taux de réponse, sans amélioration franche de la survie<sup>3,4,5</sup>. Récemment, de nouvelles armes thérapeutiques sont apparues avec l'utilisation de la Thalidomide ou d'inhibiteur du protéasome (Velcade®) qui ont permis l'obtention de quelques réponses objectives chez des patients lourdement prétraités<sup>6</sup>

Pour les patients les plus jeunes, d'âge inférieur à 65 ans, soit seulement 50 % des patients, il a été démontré que l'intensification thérapeutique avec Irradiation Corporelle Totale, Chimiothérapie et Autogreffe de cellules souches permettait d'obtenir un taux de rémission complète, et une survie sans récurrence supérieure au protocole traditionnel associant Melphalan et Prednisone<sup>7</sup> sans toutefois permettre un allongement de la survie globale. Des tentatives d'allogreffe de moelle osseuse ont pu être réalisées, avec l'obtention de bonnes réponses, toutefois grevées d'une forte mortalité liée au traitement. Actuellement, pour la grande majorité des patients, il s'agit d'une maladie incurable au pronostic sombre, puisque la médiane de survie reste de l'ordre de 30 mois avec une grande variation individuelle puisque certains patients présentent d'emblée une maladie évolutive, le décès pouvant intervenir en quelques semaines, tandis que d'autres patients ayant bénéficié d'un traitement standard survivent jusqu'à 20 ans.

La radiothérapie est une arme thérapeutique peu employée en raison de la grande diffusion de la maladie. Son utilisation reste confinée à l'irradiation des plasmocytomes malins isolés, à l'irradiation corporelle totale suivie de chimiothérapie et d'autogreffe de moelle, ainsi qu'à un rôle antalgique. Pourtant, nous avons pu démontrer dans notre laboratoire que la sensibilité des lignées de myélome aux radiations ionisantes était importante avec une Fraction Survivant à la dose de 2 Gy (SF



2Gy) proche de 10%, soit peu différente des cellules les plus radiosensibles comme celles dérivées des lymphocytes de patient présentant une mutation du gène ATM. Ceci laisse espérer que des anticorps spécifiques des cellules myélomateuses, marqués par des émetteurs de particules bêta ou alpha, présenteraient une efficacité cytotoxique importante ciblée uniquement sur la cellule tumorale. Cette nouvelle forme de traitement a déjà pu démontrer son efficacité dans le traitement du cancer médullaire de la thyroïde ou du cancer bronchique à petites cellules à l'aide d'anticorps anti-ACE radiomarqués à l'iode 131, ou encore pour des lymphomes non hogkiniens<sup>8</sup>, où de nombreux anticorps sont actuellement testés avec des résultats très positifs.

Ainsi, il apparaît que le myélome multiple est une maladie relativement fréquente et particulièrement grave, puisqu'il n'existe actuellement aucun traitement curateur. C'est pourquoi de nouvelles approches thérapeutiques doivent être envisagées. Ainsi, notre projet développe l'étude d'un anticorps spécifique de la cellule myélomateuse, dénommé B-B4, couplé à un radioélément émetteur bêta comme l'iode 131.

### 3.3 L'ANTICORPS B-B4

Parmi l'ensemble des anticorps qui ont été jusqu'à présent utilisés pour l'identification des cellules myélomateuses, certains se sont révélés être des marqueurs relativement fiables en cytofluorimétrie. C'est le cas des anticorps anti-CD38 dont l'antigène est exprimé à des taux de l'ordre de 10 fois supérieur par rapport à la plupart des cellules hématopoïétiques normales porteuses de ce marqueur.

Plus récemment, a été produit par la société Diaclone de Besançon un anticorps d'origine murine, le B-B4, beaucoup plus prometteur<sup>9,10,11</sup> ayant pour cible une structure présente à la surface des membranes intègres, le syndecan-1, encore appelé CD138, membre de la famille des glycoprotéines de type heparan sulfate. Cet antigène participe au phénomène d'adhésion cellulaire, en particulier en interagissant avec le collagène de type I<sup>12,13,14</sup>, la fibronectine<sup>15</sup>, la thrombospondine<sup>16</sup>.

L'anticorps B-B4 dont la réactivité spécifique vis-à-vis des cellules plasmocytaires a pu être démontrée par l'équipe du Pr. R. Bataille au sein de l'Unité 463 INSERM (cf annexe XI, tableaux I et II). Il ne reconnaît ni les cellules périphériques hématologiques, ni les cellules de la moelle osseuse<sup>9</sup>, ni celles des amygdales exceptés les lymphocytes B en différenciation terminale (plasmocytes) puisque cet antigène a pu être montré comme dépendant du stade de différenciation de la lignée B<sup>17</sup>. De plus, l'expression en surface du CD138 diminue rapidement sur les cellules engagées dans la voie apoptotique. Outre la présence du CD138 à la surface de cellules B malignes du sang périphérique<sup>18,19,20</sup>, sa réactivité universelle sur les cellules myélomateuses a pu être démontrée à travers l'analyse d'une centaine de cas de Myélome Multiple ainsi que sur la quasi totalité des lignées de Myélome Multiple jusqu'à présent établies<sup>21</sup>. D'autres anticorps dirigés contre le CD138 appartenant à la famille des heparan sulfate ont aussi montré leur grande spécificité de ciblage des cellules myélomateuses<sup>22</sup>.

### 3.4 ETUDES PRECLINIQUES DE RADIOIMMUNOTHÉRAPIE PAR L'ANTICORPS B-B4

Nous avons montré dans notre laboratoire que l'anticorps B-B4 n'est pas cytotoxique sur les cellules de myélome, à la différence d'anticorps bloquant comme le rituximab, ou les anticorps anti Her2-neu<sup>23</sup>. Ce même anticorps couplé à l'iode 131 provoque une mortalité cellulaire spécifique, dépendant de la dose de radioactivité injectée<sup>24</sup>. La comparaison entre les radioéléments émetteurs bêta et les émetteurs alpha montre une plus grande cytotoxicité de l'anticorps lorsqu'il est associé à des émetteurs alpha, comme le Bismuth 213. Ainsi, il semblerait intéressant de prolonger l'étude actuelle dans une étude ultérieure employant des émetteurs alpha. Actuellement, ce protocole n'est pas réalisable en clinique en raison des difficultés liées à la disponibilité des radioéléments alpha. Les études chez la souris n'ont pas été réalisées en raison de la difficulté d'obtenir un modèle valable de myélome multiple murin.

En ce qui concerne la représentation du CD138 sur les tissus non hématologiques et non tumoraux, nous avons réalisé une étude sur coupe histologique paraffinée à l'aide de l'anticorps monoclonal B-B4 ainsi qu'avec deux autres anticorps ciblant l'antigène Muc-1. Les résultats de cette analyse sont regroupés dans le tableau III de l'annexe XI<sup>24</sup>.

Des premières injections de l'anticorps B-B4 marqué à l'Indium chez 3 patients présentant un myélome multiple ont été réalisées au Royal Marsden Hospital à Londres (G-B). Il est alors retrouvé une fixation médullaire et hépatique de l'anticorps<sup>25</sup>. Cette fixation médullaire laisse augurer d'un bon ciblage de la maladie myélomateuse. Pour cette raison, la myélotoxicité représente la principale toxicité attendue lors de cette étude de phase I. Par contre la fixation hépatique peut être expliquée par l'utilisation d'anticorps sous la forme Fc d'une part, et par le couplage à l'indium qui possède un tropisme hépatique. Néanmoins, étant donné la fixation immunohistochimique de l'anticorps sur le foie (cf Annexe XI -Tableau III), les fonctions hépatiques seront particulièrement surveillées pendant la durée de l'étude.

Enfin, l'anticorps B-B4 étant d'origine murine, des réactions allergiques et l'apparition d'anticorps anti-souris pouvant réduire l'efficacité d'injections ultérieures sont susceptibles d'apparaître. Dans ce but, la société Diaclone développe actuellement une humanisation de l'anticorps.

#### IV OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'**objectif principal de l'étude** est de déterminer la dose recommandée de l'anticorps B-B4 marqué à l'iode 131 à l'aide d'une étude de phase I d'escalade de dose en déterminant la toxicité limitant la dose et la dose recommandée.

**Les objectifs secondaires** sont d'évaluer la bio-distribution de l'anticorps B-B4 dans l'organisme par immunoscintigraphie, ainsi que l'efficacité anti-tumorale du traitement. Cette étude sera couplée à une étude dosimétrique et pharmacocinétique. Une analyse d'immunogénicité sera réalisée après l'injection de l'anticorps B-B4. Les résultats obtenus serviront à l'élaboration ultérieure d'une étude de l'anticorps B-B4 couplé à un émetteur de particules alpha.

Cette étude se décompose en quatre étapes :

<b>Étape1</b>	<b>Procédures d'inclusion</b> et prélèvement des cellules souches hématopoïétiques s'il n'existe pas de greffon disponible.
<b>Étape 2</b>	<b>Etude pré-thérapeutique</b> de dosimétrie qui sera réalisée chez tous les patients
<b>Étape 3</b>	<b>Etape thérapeutique</b> : Radioimmunothérapie bêta ( <i>objectif principal</i> ) qui sera réalisée uniquement chez les patients pour qui les résultats de l'étude dosimétrique sont favorables.
<b>Étape4</b>	<b>Evaluation de la toxicité et de l'efficacité anti-tumorale</b> après administration de la dose thérapeutique, et éventuellement ré-injection des cellules souches hématopoïétiques.

#### V. METHODOLOGIE

##### 5.1 ETAPE 1 : PROCEDURES D'INCLUSION ET DE RECUEIL DES CELLULES SOUCHES

Les investigateurs qui souhaiteront inclure un patient transmettront en premier lieu à l'investigateur principal les informations médicales pertinentes.

###### 5.1.1 Informations à transmettre à l'investigateur principal pour inclusion

- Identification du patient à savoir les trois premières lettres du nom et du prénom,
- Sexe,
- Age,
- Traitement médical en cours
- « Performance Status »,
- Existence ou non de cellules souches déjà prélevées et
- si oui la quantité disponible
- si non, date prévue pour le recueil après signature du consentement
- Antécédents médicaux, chirurgicaux et allergiques
- Dose de radiothérapie reçue antérieurement pour chaque organe à toxicité limitante éventuelle (moelle osseuse, foie, rein, poumons)
- Détail des traitements reçus antérieurement,
- Myélogramme au diagnostic montrant la présence d'au moins 10 % de plasmocytes et qui évaluera la myélodysplasie.
- Type d'immunoglobuline secrété par le myélome
- Consentement daté et signé du patient
- Nom du médecin co-investigateur assurant le suivi

Le co-investigateur sera alors avisé si le patient est éligible ou non dans l'étude. Le consentement du patient sera recueilli avant de débiter le bilan d'inclusion. Toutes ces informations devront être transmises par télécopie à l'investigateur principal : n°02 40 35 66 97

Les dates prévues pour les injections pré-thérapeutiques et thérapeutiques seront alors envoyées en retour au médecin co-investigateur.

### 5.1.2 Critères d'inclusion :

- Patient ayant un diagnostic confirmé de myélome multiple (>10 % de plasmocytes sur un myélogramme antérieur)
- Sécrétion d'une immunoglobuline monoclonale
- Pas de myélodysplasie évaluée au myélogramme
- Maladie réfractaire ou en rechute après au moins 3 lignes thérapeutiques (Traitement de référence : protocole Alexanian qui associe Melphalan et Prednisone – 2<sup>ème</sup> ligne de traitements : protocole V.A.D. Vincristine, Anthracycline, Dexaméthasone ou protocole Thalidomide – 3<sup>ème</sup> ligne : inhibiteurs du protéasome, Velcade®).
- Patient ayant daté et signé le formulaire de consentement éclairé
- Recueil de cellules souches périphériques autologues contenant au moins 2. 10<sup>6</sup> cellules CD 34<sup>+</sup>/kg
- Age > 18 ans
- « Performance Status » < 2 (cf. annexe I), espérance de vie de plus de 3 mois
- Pas de chimiothérapie ni de radiothérapie dans les 4 semaines précédant l'inclusion
- Pas de chirurgie majeure dans les 4 semaines précédant le bilan d'inclusion
- Pas de bisphosphonates dans les 2 semaines qui précèdent la radioimmunothérapie, sauf en cas de traitement instauré plus de 3 mois auparavant.
- Normalité du bilan biologique :
  - Créatininémie inférieure ou égale à 1,5 fois la normale du laboratoire
  - Bilan hépatique : inférieure ou égale à 1,5 fois la normale du laboratoire (Bilirubinémie libre et conjuguée, TGO, TGP,  $\gamma$ GT, PAL)
  - Hémoglobine  $\geq 8$  g/mm<sup>3</sup>
  - Leucocytes  $\geq 3$  000/mm<sup>3</sup>
  - Neutrophiles  $\geq 1$  500/mm<sup>3</sup>
  - Plaquettes  $\geq 100$  000/mm<sup>3</sup>

Les examens biologiques avant inclusion devront être réalisés moins de 4 semaines avant l'inclusion.

L'investigateur transmettra l'ensemble du bilan d'inclusion à l'investigateur principal par télécopie au n° : 02 40 35 66 97.

Après vérification des critères d'inclusion décrits ci-dessous l'investigateur principal confirmera l'inclusion du patient dans l'étude. Le palier de la dose et la date d'injection seront également confirmés.

### 5.1.3 Critères d'exclusion :

- Patient présentant un autre cancer à l'exclusion d'un carcinome *in situ* du col

- utérin ou d'un carcinome basocellulaire cutané
- Patients porteurs d'autre(s) pathologie(s) sévère(s) empêchant d'étudier la tolérance et de mener l'étude à son terme
- Patiente enceinte ou ne voulant pas prendre un traitement contraceptif pendant trois mois après le traitement
- Recueil de cellules souches périphériques contenant moins de 2.10<sup>6</sup> cellules CD 34<sup>+</sup>/kg
- Les patients inclus dans un autre protocole thérapeutique expérimental
- Patients ayant déjà bénéficié d'un traitement par radioimmunothérapie
- Myélodysplasie évaluée au myélogramme
- Patient présentant une dysthyroïdie
- Allergie à l'iode
- Patient inapte à la signature d'un consentement éclairé

### 5.1.4 – Prélèvement des cellules souches hématopoïétiques:

Ce prélèvement est prévu pour n'être utilisé qu'en cas de toxicité médullaire prolongée (Cf. paragraphe 6.1.2). Après inclusion du patient et bilan pré-autogreffe (Cf. annexe II), le prélèvement des cellules souches hématopoïétiques sera réalisé suivant le protocole habituellement utilisé dans le service d'Hématologie Clinique (gestion des prélèvements par l'E.F.S. des Pays de la Loire).

Les cellules souches périphériques (CSP) seront collectées après mobilisation par du G-CSF (Granocyte® 10  $\mu$ g/kg/j) pendant 6 jours. Un à trois recueils seront effectués à partir du jour 6.

Les contrôles virologiques habituels seront réalisés à ce moment :

- Sérologie VIH1 et 2
- Sérologie HBV et HCV
- Sérologie HTLV1 et 2
- VDRL, TPHA

La numération des cellules CD34<sup>+</sup> dans le sang sera effectuée avant chaque collecte. La collecte est effectuée si la numération de CD34<sup>+</sup> dans le sang est  $\geq 20/\mu$ l. Un total d'au moins 2.10<sup>6</sup> cellules CD34<sup>+</sup>/kg devra être collecté.

## 5.2 PROCEDURE APRES INCLUSION, AVANT L'ETAPE PRE-THERAPEUTIQUE

### 5.2.1 Bilan complémentaire après inclusion du patient dans l'étude clinique

- Mesure de la masse tumorale à l'aide de :
  - Myélogramme pour :
    - caryotype médullaire centré sur les plasmocytes
    - Evaluation de la plasmocytose et de la myélodysplasie
  - Electrophorèse des protéines sanguines et/ou urinaires
  - Dosage de la  $\beta$ 2microglobuline
  - Dosage de la CRP, LDH

- Clichés standards du squelette entier
- Protéinurie des 24 h
- Electrocardiogramme
- Epreuves Fonctionnelles Respiratoires
- Tomographie par Emission de Positions au <sup>18</sup>FDG
- Dosage de la TSH
- Analyse d'urine par bandelettes (leucocytes, hématies, protéines, glucose)

### 5.2.2 Deux semaines avant l'injection pré-thérapeutique :

- Prescription pour tous les patients d'un traitement à base de Lugol de J-7 avant dose traceuse à J+21 de la dose thérapeutique : Lugol 5 % 30 gouttes par jour, contenant de l'iode non radioactif afin de saturer la thyroïde, et d'éviter son irradiation non désirée.
- Les corticoïdes seront maintenus en fonction des nécessités médicales selon la décision de l'investigateur. L'investigateur s'attachera à limiter la prescription de corticoïdes dans les jours précédant les injections pré-thérapeutique et thérapeutique, de façon à ne pas masquer une éventuelle réaction allergique.
- Arrêt des bisphosphonates, sauf si traitement instauré depuis plus de 3 mois.

## 5.3 ETAPE 2 : ETAPE PRÉ-THÉRAPEUTIQUE ET DE DOSIMÉTRIE

### 5.3.1 Modalités

Elle aura pour objectif d'estimer la dose absorbée par le(s) site(s) tumoral(aux) et par les différents organes, après l'injection de 20 mg/m<sup>2</sup> de l'anticorps couplé à une dose d'activité traceuse de 370 MBq (10 mCi). 10 % de la dose seront perfusés en 5 minutes, et si les constantes vitales restent stables, la dose totale sera injectée en 10-25 min suivant le protocole décrit en annexe IV.

### 5.3.2 Bilan pré-thérapeutique :

**Ce bilan doit être réalisé moins d'une semaine avant l'injection pré-thérapeutique. Il comprend :**

- Tomodensitométrie pour mesurer les volumes des régions d'intérêt (tumeur, organes critiques). Cette étude sera réalisée en même temps que la TEP <sup>18</sup>FDG.
- Etude de transmission dans les 72 heures qui précèdent le début de l'étude dosimétrique en médecine nucléaire.
- Pour les femmes en âge de procréer, test de grossesse
- Numération formule sanguine et dosage des plaquettes
- Ionogramme sanguin, calcium
- Fonction rénale : urée, créatininémie
- Fonction hépatique : Bilirubinémie libre et conjuguée, TGO, TGP, γGT et PAL

Les examens biologiques seront idéalement réalisés le jour de l'étude de

transmission.

Si le début de l'étude de dosimétrie ou bien l'injection thérapeutique devait être reportée d'une semaine pour une raison justifiée, la décision de refaire ou pas certains bilans sera prise par l'investigateur principal.

### 5.3.3 Critères de sortie prématurée après inclusion avant injection pré-thérapeutique:

Si les critères d'inclusion et d'exclusion ne sont plus satisfaits au moment de l'injection, le patient est immédiatement exclu de l'étude. Les données du patient seront conservées.

### 5.3.4 Couplage de l'anticorps au radioisotope

L'anticorps B-B4 sera fourni gracieusement par la société Diaclone (Besançon, France). Le but de ce protocole est d'obtenir un anticorps radiomarqué avec une activité spécifique de 185 MBq/mg et de qualité injectable à l'homme.

Le protocole de marquage de l'anticorps B-B4 est décrit avec précision en fin de document (cf annexe IV). Il consiste à fixer l'iode 131 sur l'anticorps B-B4 à l'aide d'une méthode dite à l'iodogène. L'anticorps ainsi marqué est ensuite purifié sur une colonne échangeuse d'anions qui permet l'élimination de l'iode libre. La troisième étape permettra de contrôler la pureté radiochimique, l'activité spécifique, l'immunoréactivité de l'anticorps radiomarqué et enfin la stérilité et d'absence de pyrogène dans les solutions d'anticorps radiomarquées.

Ce marquage relatif à l'étude dosimétrique sera réalisé à Nantes selon les bonnes pratiques de laboratoire par un radiopharmacien qualifié.

En cas de marquage ne permettant pas d'obtenir une activité spécifique suffisante, l'anticorps ne sera pas injecté le jour même, et une semaine plus tard une nouvelle tentative de marquage sera réalisée.

### 5.3.5 Imagerie, dosimétrie, pharmacocinétique

L'injection intraveineuse de 20 mg/m<sup>2</sup> de surface corporelle du B-B4 marqué par 370 MBq (10 mCi) d'iode 131 permettra de réaliser une étude dosimétrique (« dose traceuse »).

Les volumes des régions d'intérêt (tumeur, organe critique) seront déterminés par une tomodensitométrie du corps entier réalisée sur la dose traceuse avant la dose thérapeutique.

La dosimétrie sera réalisée par un radiophysicien, selon la méthodologie préconisée par le MIRD Committee (Medical International Radiation Dose) <sup>26</sup>.

L'activité présente dans les organes fixant le radiopharmaceutique sera évaluée à partir d'images scintigraphiques. Ces images d'immunoscintigraphies seront réalisées à J0 (une heure après l'injection et avant que le patient a uriné), à J1, J2, J3, J6, J7 selon la procédure d'imagerie décrite en annexe VII.

Des échantillons sanguins seront prélevés à J0 (5 minutes après la fin de l'injection, 30 minutes après H1, H2, H4, J1, J2, J3, J6 et J7 (avant l'injection thérapeutique) au moment des images scintigraphiques pour déterminer la clairance sanguine de l'anticorps. La procédure des prélèvements sanguins ainsi que le traitement des tubes est décrit en annexe VI.

Les urines seront collectées entre J<sub>0</sub> et J<sub>3</sub>.

Les jours des immunoscintigraphies et les prélèvements sanguins pourront être modifiés pour des raisons justifiées uniquement après l'accord de l'investigateur principal et à condition que le nombre total d'images et de prélèvements sanguins soit conservé.

Ces différents prélèvements permettront de déterminer la composante sanguine de l'irradiation médullaire, et la validation de l'imagerie quantitative.

#### Principe de l'imagerie quantitative :

La correction d'atténuation sera effectuée à l'aide d'une image en transmission du patient, réalisée avant l'injection du radiopharmaceutique. La correction de la diffusion sera effectuée selon la méthode de Jasczacak <sup>27,28</sup>.

Les acquisitions seront réalisées en mode planaire corps entier selon la procédure décrite en annexe VII. Les acquisitions à différents temps après injection du radiopharmaceutique seront réalisées afin de pouvoir apprécier la cinétique de fixation-rétention du produit. Typiquement, ces acquisitions sont réalisées à J<sub>0</sub> (jour de l'injection du radiopharmaceutique), 1 h après l'injection, puis à J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub>, J<sub>3</sub>, J<sub>6</sub> et J<sub>7</sub>. Après analyse des 5 premiers patients, le nombre et l'intervalle entre les scintigraphies seront réévalués. Si le protocole devait être modifié après cette analyse, il ferait l'objet d'un amendement. Les images corps entier, après correction de la diffusion et de l'atténuation, permettront de quantifier l'activité selon la méthode de la moyenne géométrique. Si nécessaire, des acquisitions statiques ou tomographiques pourront être réalisées à la demande des médecins ou des physiciens.

### **5.3.6 Surveillance en cours d'injection**

Le patient bénéficiera d'une surveillance continue incluant pouls, tension, conscience, cardioscope, avant, pendant et deux heures après l'injection de la dose traceuse. Une infirmière notera tous les paramètres de la surveillance clinique toutes les 15 minutes. En cas de symptômes menaçant, un traitement adapté sera mis en place (cf annexes V et VIII)

### **5.4 ETAPE 3 : ETAPE THERAPEUTIQUE**

La visualisation du squelette pelvi-rachidien témoignant d'un ciblage tumoral autorise la poursuite de l'étude et donc le passage à l'étape thérapeutique.

#### **5.4.1 Critères de sortie prématurée après inclusion avant injection thérapeutique:**

Une prise de sang sera réalisée dans la semaine précédant l'injection afin de s'assurer que la Numération de Formule Sanguine, les plaquettes, la créatinine, le bilan hépatique répondent toujours aux critères d'inclusion. Les critères qui n'autorisent pas l'injection thérapeutique sont :

- Réaction allergique sévère après la première injection (annexe V)
- Non visualisation de la moelle osseuse lors de la scintigraphie après une dose traceuse
- Altération de l'état général survenant entre la date d'inclusion et la date prévue pour l'injection de la dose traceuse
- Altération du bilan biologique :
  - Créatininémie >1,5 fois la normale du laboratoire
  - Bilan hépatique > 1,5 fois la normale du laboratoire
  - Hémoglobine < 8 g/mm<sup>3</sup>
  - Leucocytes < 3 000/mm<sup>3</sup>
  - Neutrophiles < 1 500/mm<sup>3</sup>
  - Plaquettes < 100 000/mm<sup>3</sup>

#### 5.4.2 Injection thérapeutique :

L'injection et l'hospitalisation auront lieu en chambre radioprotégée. Le radiomarquage à haute activité sera réalisé dans le service de médecine nucléaire du Centre René Gauducheau par le radiopharmacien qualifié et selon la procédure décrite (annexe III).

Il sera délivré une dose fixe de 20 mg/m<sup>2</sup> de surface corporelle de l'anticorps B-B4 marqué à une activité de départ de 0,55 GBq/m<sup>2</sup> (15 mCi/m<sup>2</sup>). L'anticorps sera administré à une concentration de 0,05 à 0,1 mg/ml et de moins de 3 mCi/ml dans un volume total de 250 à 500 ml. La perfusion devra se prolonger sur 60 minutes.

La durée totale d'hospitalisation dépendra de l'élimination de l'anticorps radioactif. Le patient sortira lorsque le débit d'exposition mesuré à un mètre, patient debout, sera inférieur à 20 µSv/h.

#### 5.4.3 Surveillance après l'injection

Le patient bénéficiera d'une surveillance permanente par cardioscope avant, pendant et deux heures après l'injection de la dose traceuse. Une infirmière notera tous les paramètres de la surveillance clinique (pouls, tension artérielle, conscience) toutes les 15 minutes. En cas de symptômes menaçants, un traitement adapté sera mis en place (annexe V)

Le débit de dose (mesure externe) sera mesuré tous les jours pendant l'hospitalisation.

De plus, une scintigraphie sera réalisée 7 jours après l'injection de la dose thérapeutique, afin de vérifier la dosimétrie calculée à partir de la dose traceuse.

Des prélèvements sanguins pour une étude pharmacocinétique seront prélevés selon l'annexe VII, à J3, le jour de la sortie, à J7 (le jour de la scintigraphie).

Une quantification de l'activité sanguine sera effectuée avant la réinjection des cellules souches si elle était nécessaire, afin de s'assurer qu'il n'y aura pas de risque de radiolyse du greffon.

#### 5.4.4 Augmentation de dose

La phase thérapeutique consistera en une étude de phase I selon la méthode de Faries (ou Modified Continual Reassessment Method MCRM). Le premier palier débutera à la dose D de 0,55 GBq/m<sup>2</sup> (15 mCi/m<sup>2</sup>), puis les paliers suivront le diagramme suivant : 2 D, 3,3 D, 5 D, 7 D, 9 D (cf annexe XII) afin de déterminer la toxicité limitant la dose (DLT) et ainsi la dose recommandée.

Une toxicité limitant la dose (DLT) est définie par l'apparition d'une toxicité hématologique de grade III de plus de 14 jours, ou de grade IV de plus de 7 jours, ou de toute toxicité non hématologique de grade III ou IV (cf annexe VIII).

Une toxicité non limitante est définie par l'apparition d'une toxicité hématologique de grade II ou de grade III de moins de 14 jours ou extra-hématologique de grade II (cf annexe VIII)

Conformément à la MCRM, un premier malade sera inclus pour chaque palier d'activité.

Si, pour un palier P, aucune toxicité n'est notée pour ce patient, le prochain patient inclus est traité au palier de dose P+1 (cf annexes VIII et XII). Un intervalle de 6 semaines devra séparer le traitement du dernier malade d'un palier donné et celui du premier malade du palier suivant. Cet intervalle de 6 semaines représente la période où l'observation d'une toxicité éventuelle est la plus probable, mais une durée prolongée peut s'avérer nécessaire pour établir un nadir définitif.

S'il apparaît une toxicité non limitante, 2 patients supplémentaires seront inclus à ce palier avant le passage au prochain palier P+1 (cf annexe VIII).

S'il apparaît une toxicité limitant la dose (DLT) à un palier P, un nouveau patient sera inclus 3 semaines plus tard et ce jusqu'à six malades au maximum.

S'il survient à nouveau un autre cas de DLT au palier P, les inclusions seront arrêtées à ce palier, L'escalade de dose n'est pas poursuivie.. Les inclusions sont complétées au palier P-1 jusqu'à 6 patients. Si aucun ou un seul patient présente une DLT à ce palier P-1, ce palier définira la dose recommandée. Les inclusions reprendront au palier de la dose recommandée, pour traiter un total de 15 patients à ce niveau de dose. L'étude sera alors terminée.

Si aucun autre cas de DLT n'est observé au palier P, l'escalade est poursuivie selon le schéma ci-dessus.

## 5.5 ETAPE 4 : EVALUATION DE LA TOLERANCE ET DE L'EFFICACITÉ

### 5.5.1 Evaluation de la tolérance

#### 5.5.1.1 Tolérance immédiate:

Un monitoring continu par cardioscope sera réalisé avant, pendant et 2 heures après l'injection.

#### 5.5.1.2 Tolérance à moyen terme :

#### Sur des critères cliniques

Il comprend un examen cardio-vasculaire, respiratoire, neurologique, hématologique et digestif. Ce bilan clinique sera effectué tous les jours d'imagerie pour la phase pré-thérapeutique et durant les jours d'hospitalisation en chambre protégée puis chaque semaine pendant 6 semaines. Ces examens cliniques complets seront poursuivis à 3, 6, 9 et 12 mois après l'injection thérapeutique.

#### Sur des critères biologiques :

Une numération formule sanguine, plaquettes, un bilan hépatique (TGO, TGP, gamma GT, un bilan rénal (urée, créatinine) seront répétés deux fois par semaine pendant 6 semaines puis à 3, 6, 9 et 12 mois. Le dosage de la TSH sera contrôlé à M3, M6, M12

Si une toxicité hématologique est observée, les prélèvements sont intensifiés, à raison d'une NFS tous les 2 jours, jusqu'à la remontée à des niveaux normaux ou aux niveaux de référence pendant au moins deux semaines.

Si une toxicité hépatique ou rénale est observée, les prélèvements sont intensifiés jusqu'à la remontée aux niveaux normaux ou de référence pendant au moins deux semaines.

Un suivi de la myélodysplasie sera réalisé après 3 mois et 12 mois par analyse du myélogramme.

#### Exploration fonctionnelle :

En fonction du ciblage des organes tels que le cœur et les poumons par l'anticorps, (visualisé sur les immunoscintigraphies post thérapeutiques), des investigations supplémentaires seront réalisées.

#### La tolérance immunologique :

Elle sera évaluée en recherchant l'apparition d'anticorps humains anti-souris à J14, J28 et J90, puis à 6, 9 et 12 mois suivant l'injection de l'immunoconjugué (cf annexe VI).

### 5.5.2 - Evaluation de l'efficacité du traitement

Elle sera évaluée par des examens biologiques réalisés à 1, 3, 6, 9 et 12 mois, comprenant une électrophorèse des protéines sanguines et urinaires pour un dosage pondéral du pic d'immunoglobuline monoclonal, couplé à un dosage de la calcémie.

Dans le même but, une Tomographie par Emission de Positions au <sup>18</sup>FDG sera réalisée 1 mois et 3 mois après l'injection thérapeutique.

La réponse tumorale sera appréciée en fonction du dosage de l'immunoglobuline.

Elle sera stratifiée en :

- Réponse complète : disparition complète du pic
- Réponse partielle majeure : plus de 75 % de diminution du pic
- Réponse partielle modérée : 50 à 74 % de diminution du pic
- réponse partielle mineure : 25 à 49 % de diminution du pic
- Stabilisation : de plus ou moins 24 % de variation du pic
- Progression : augmentation de plus de 25 % du pic ou hypercalcémie ou apparition d'une nouvelle lésion osseuse

En cas de disparition complète du pic monoclonal, un caryotype médullaire et une immunofixation médullaire devront confirmer la réponse complète biologique.

## VI. GESTION DES EFFETS INDÉSIRABLES

### 6.1 LES EFFETS INDÉSIRABLES

Les toxicités observées seront cotées de 1 à 4, selon les critères définis dans l'annexe VIII.

#### 6.1.1 Effets immédiats

Les effets indésirables immédiats susceptibles d'intervenir sont : réactions allergiques pouvant aller jusqu'au choc anaphylactique, douleur thoracique, abdominale ou dorsale, fièvre et frissons, prurit et érythème.

#### 6.1.2 Effets à moyen terme

A moyen terme peut survenir une toxicité hématologique, incluant une anémie, une thrombopénie, une leuconéutropénie pouvant faciliter le survenue d'infections. Seront également recherchées les toxicités éventuelles au niveau du foie, du rein, du cœur, des poumons et des intestins.

Le traitement de ces effets indésirables comprend des transfusions de globules rouges et de plaquettes en cas d'anémie ou de thrombopénie.

En cas de leuco-neutropénie de grade IV fébrile, un traitement antibiotique est

instaurée.

En cas de leuco-neutropénie de grade IV non fébrile de moins de 7 jours, aucun traitement spécifique n'est instauré.

En cas de leuco-neutropénie de grade IV de plus de 7 jours, ou de thrombopénie de grade IV de plus de 7 jours et/ou d'anémie de grade 3 de plus de 7 jours résistantes aux transfusions, une ré-injection de cellules souches est réalisée dans le service d'Hématologie Clinique, selon les critères et les procédures du service (cf. 5.5.1.2).

La réinjection des cellules souches devrait limiter l'importance et la durée de l'aplasie médullaire et éviter ainsi une hospitalisation en milieu protégé. En cas d'aplasie sévère (neutropénie inférieure à 500 PNN/mm<sup>3</sup>), les malades seront hospitalisés en secteur protégé pendant le temps nécessaire à la récupération d'une fonction médullaire satisfaisante, c'est à dire absence de problème infectieux et PNN>500/mm<sup>3</sup>.

De plus, en cas de toxicité hématologique, elle ne devrait survenir qu'après un délai de 30 j qui permet une réinjection possible des cellules souches périphériques sans que l'irradiation résiduelle ne puisse avoir d'effets.

Afin de vérifier cette radioactivité résiduelle, un dosage de la radioactivité sanguine sera réalisé en cas d'indication de réinjection de CSP. Cette réinjection ne sera possible que si cette radioactivité sanguine est  $\leq 1 \mu\text{Ci/ml}$ .

### 6.1.3 Effets à long terme

A long terme, les effets secondaires attendus sont inconnus, et pourraient être majorés par les traitements reçus antérieurement (chimiothérapie, radiothérapie). Ils incluent des risques d'insuffisance hépatique, rénale, thyroïdienne, pulmonaire ou cardiaque ainsi qu'un risque d'hypofertilité et de mutagenèse.

## 6.2 CONDUITE À TENIR EN CAS D'EFFETS INDÉSIRABLES

### 6.2.1 Événements attendus et inattendus

Tous les événements indésirables rencontrés au cours de l'étude, qui sont constatés par le médecin ou rapportés par le patient, seront consignés dans le cahier d'observation dans la section prévue à cet effet.

L'intensité des événements indésirables sera cotée selon les critères CTC (Commun Toxicity Criteria) version 2.0. Pour tout événement non noté dans la classification, la cotation sera la suivante :

- 0 = aucun
- 1 = bénin
- 2 = modéré
- 3 = sévère
- 4 = mettant en jeu le pronostic vital

### Evènements attendus

Toute toxicité attendue de grade 2, 3 ou 4 doit être signalée dans les 24 heures à la Cellule de promotion de la recherche clinique.

Les toxicités attendues de grade 1 ne feront pas l'objet de déclarations spécifiques mais seront reportées dans le cahier d'observation.

### Evènements inattendus

Toute toxicité inattendue de Grade 3 ou 4 doit être signalée dans les 24 heures à la Cellule de promotion de la recherche clinique.

Tout événement inattendu de grade 1 à 2 et jamais encore observé doit être signalé dans les 24h à la Cellule de promotion à la recherche clinique.

Les toxicités de grade 1 à 2 qui ont fait déjà l'objet d'une déclaration à la cellule de promotion à la recherche clinique ne feront plus l'objet d'une déclaration mais seront rapportés dans le cahier d'observation.

### 6.2.2 Événements indésirables graves (EIG)

Tout événement indésirable grave doit être signalé à la Cellule de promotion de la recherche clinique (Fax : 02-40-08-71-67) **immédiatement et au plus tard dans les 24 heures ouvrables** suivant son apparition, en remplissant le formulaire prévu à cet effet.

Seront considérés comme événements indésirables graves, tous les événements entraînant un risque significatif pour le patient tels que les événements suivants :

- nécessitant une hospitalisation ou une prolongation d'hospitalisation,
- entraînant le décès quelle qu'en soit la cause lorsqu'il est survenu pendant l'essai ou dans les quatre semaines après la fin de l'essai,
- mettant en jeu le pronostic vital,
- susceptibles d'entraîner une invalidité ou une incapacité correspondant à un handicap cliniquement significatif, qu'il soit temporaire ou permanent,
- révélation d'une anomalie congénitale,
- tout autre événement représentant un risque significatif pour le malade.

### Déclaration aux autorités des Evènements Indésirables Graves

Après réception de la notification d'un EIG, le promoteur (la Cellule de promotion de la recherche clinique dans le cas présent) s'engage à transmettre aux autorités dans les 7 jours, les décès et les EIG comportant une menace vitale et dans les 15 jours les autres EIG.



## VII. PRODUITS UTILISÉS

### 7.1. Traçabilité

#### Anticorps

Un tableau sera tenu à jour, il indiquera le numéro de lot, le jour de la dispensation, et l'identification des patients qui ont été injectés.

#### Iode 131

Les bons de livraison de l'iode 131 seront conservés.

Toutes les informations relatives au marquage de l'anticorps seront conservées dans le service de médecine nucléaire du Centre René Gauducheau.

### 7.2 Destruction des produits de l'étude

Les flacons vides non radioactifs seront conservés dans le service de médecine nucléaire du Centre René Gauducheau. Le promoteur de l'étude donnera l'autorisation de leur destruction après le passage de l'attaché de recherche clinique.

Les lots d'anticorps non consommés seront restitués au partenaire industriel (Société Diaclone).

Les produits radioactifs sont détruits selon les habitudes du service de médecine nucléaire du Centre René Gauducheau.

## VIII. ASPECTS MATERIELS ET LEGAUX

### 8.1 GESTION DES INCLUSIONS

Le formulaire d'inclusion sera transmis par télécopie, par l'investigateur incluant le patient et en temps réel, à la Cellule de Promotion de la Recherche Clinique au n° 02 40 08 71 67 .

### 8.2 CAHIERS D'OBSERVATION

Un cahier d'observation sera créé par patient. Il sera complété par l'investigateur ou un ARC. Les feuilles devront être remplies au stylo bille bleu ou noir. En cas de données manquantes, l'investigateur devra inscrire DM (données manquantes). En cas de modification d'une donnée inscrite, la donnée fautive sera barrée, la valeur exacte sera notée à côté et la modification sera datée et annotée des initiales de l'investigateur. Le cahier d'observation reprendra les différentes étapes de la prise en charge du patient dans le protocole. Les cahiers seront stockés dans le secteur d'archivage des protocoles du Service.

### 8.3 CONSENTEMENT ÉCLAIRÉ ÉCRIT

L'investigateur s'engage à expliquer au patient de façon claire et juste le protocole et à lui demander un consentement éclairé et écrit (annexes IX et X). Il remettra au patient un exemplaire de la lettre d'information et un formulaire de consentement. Le patient ne pourra être inclus dans l'étude qu'une fois qu'il aura pris connaissance du formulaire d'information et signé le consentement. Le patient et l'investigateur conserveront chacun un exemplaire original du consentement. L'exemplaire de l'investigateur sera classée dans le cahier d'observation du patient.

### 8.4 Déclaration d'Helsinki, loi Huriel, Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale

L'investigateur principal s'engage à réaliser cette étude selon les recommandations de la déclaration d'Helsinki, les dispositions de la loi numéro 88-1138 du 20 Décembre 1988, dite loi Huriel, modifiée par la loi numéro 90-86 du 23 Janvier 1990, la loi numéro 90-549 du 2 juillet 1990 et la loi numéro 91-73 du 18 Janvier 1991 et l'article R.94630 du 25 Juillet 1994 et selon les bonnes Pratiques Clinique.

L'investigateur principal s'engage à soumettre le projet d'étude à l'avis préalable du Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale (CCPPRB) n°2 des Pays de Loire. Les informations communiquées portent d'une part sur le modalités et la nature de la recherche et d'autre part, sur les garanties prévues pour les patients participant à cet essai.

### 8.5. AMENDEMENTS AU PROTOCOLE

Toute modification du protocole doit faire l'objet d'un amendement et d'une note d'information au CCPPRB n°2 des Pays de Loire. Elle ne prendra effet qu'après l'avis favorable du CCPPRB n°2 des Pays de Loire et notification au ministère. Les formulaires d'information et de recueil du consentement du patient devront être modifiés si besoin.

### 8.6 MONITORAGE DE L'ÉTUDE

Le monitoring de l'étude sera assuré par la Cellule de promotion à la recherche clinique. Il aura en particulier pour but de s'assurer de la présence des consentements, de la transmission des Evénements Indésirables Graves en temps voulu, de l'adhésion au protocole .

Le protocole a été classé en catégorie III pour le risque des patients. **Tous les dossiers seront vérifiés à 100 %.**

Le protocole sera suivi de la manière suivante :

- Une réunion de mise en place avec l'investigateur principal sera faite avant le début de l'essai (validation de la qualification du risque, rappel des Bonnes Pratiques Cliniques, organisation de la recherche, monitoring prévu).
- Il sera demandé à l'investigateur de transmettre les inclusions à la Cellule de promotion de la recherche clinique, dans les 24 heures.

Les visites de monitoring sur site seront organisées après rendez-vous avec l'investigateur ; les Attachés de Recherche Clinique de promotion devront pouvoir consulter :

- les cahiers de recueil de données des patients inclus
- les dossiers médicaux et infirmiers des patients (médecine nucléaire et hématologie)
- le classeur investigateur

Le monitoring vérifiera particulièrement les 6 points suivants :

- la présence des consentements éclairés et signés
- le respect des critères d'inclusion
- le critère principal de jugement
- les critères secondaires de jugement
- la surveillance et la déclaration des EIG
- le signalement de faits nouveaux (amendements)

### 8.7 ANONYMAT DES PATIENTS

En signant ce protocole l'investigateur principal et l'ensemble des co-investigateurs s'engagent à maintenir confidentielles les identités des patients ou patientes qui ont participé à l'étude. Un numéro de cahier sera donné lors de la pré-inclusion du patient. Les 3 premières lettres du nom, les 3 premières lettres du prénom, et la date de naissance seront les seules informations qui figureront sur le cahier d'observation et qui permettront de rattacher à posteriori le cahier d'observation au patient.

### 8.8 CONFIDENTIALITÉ

Le fichier informatique utilisé pour réaliser la présente recherche a fait l'objet d'une demande d'autorisation à la CNIL (Commission Nationale Informatique et Libertés), en application de la loi « Informatique et libertés ». Les données médicales de chaque patient ne seront transmises qu'au promoteur, et, le cas échéant aux autorités sanitaires habilitées, dans les conditions garantissant leur confidentialité.

Le promoteur et les autorités de tutelle pourront demander un accès direct au dossier médical pour vérification des procédures et/ou des données de l'essai clinique, sans violer la confidentialité et dans les limites autorisées par les lois et réglementations.

### 8.9 ARCHIVAGE DES DONNÉES

Les données individuelles seront toutes notées sur le cahier d'observation. Chaque cahier sera stocké et archivé en fonction des habitudes du centre investigateur. Le stockage des cahiers durera 15 ans.

### 8.10 PUBLICATIONS

Il sera formé un comité scientifique qui comprendra une partie des investigateurs. Toute communication écrite ou orale des résultats devra obtenir l'autorisation de ce comité scientifique.

### 8.11 ASSURANCES

Le promoteur déclare avoir souscrit une police d'assurance garantissant, selon les clauses prévues au contrat et dans la limite des sommes fixées, les conséquences pécuniaires de sa responsabilité civile telle qu'elle résulte de l'application de l'article L 209-7 du code de la Santé Publique. La police couvre notamment les investigateurs ainsi que l'ensemble de leurs collaborateurs et préposés effectuant les essais cliniques en conformité avec les lois en vigueur. La souscription d'une telle police par le promoteur n'a pas d'effet de le priver de ses droits de recours contre les personnes précitées en cas de fautes de celles-ci.

IX **BIBLIOGRAPHIE**

1. Bataille R, Harousseau JL: Multiple myeloma. *N Engl J Med* 336:1657-64, 1997
2. Alexanian R, Haut A, Khan AU, Lane M, McKelvey EM, Migliore PJ, Stuckey WJJ, Wilson HE: Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *Jama* 208:1680-5, 1969
3. Alexanian R, Dimopoulos M: The treatment of multiple myeloma. *New England Journal Of Medicine* 330:484-9, 1994
4. Salmon SE, Crowley JJ, Grogan TM, Finley P, Pugh RP, Barlogie B: Combination chemotherapy, glucocorticoids, and interferon alfa in the treatment of multiple myeloma: a Southwest Oncology Group study [see comments]. *Journal Of Clinical Oncology* 12:2405-14, 1994
5. Samson D, Gaminara E, Newland A, Van de Pette J, Kearney J, McCarthy D, Joyner M, Aston L, Mitchell T, Hamon M, al e: Infusion of vincristine and doxorubicin with oral dexamethasone as first-line therapy for multiple myeloma [see comments]. *Lancet* 2:882-5, 1989
6. Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, Munshi N, Anaissie E, Wilson C, Dhodapkar M, Zeddis J, Barlogie B: Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma [see comments]. *N Engl J Med* 341:1565-71, 1999
7. Attal M, Harousseau J-L, Stoppa A-M, Sotto J-J, Fuzibet J-G, Rossi J-F, Casassus P, Maisoneuve H, Facon T, Ifrah N, Payen C, Bataille R: A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 335:91-97, 1996
8. Kaminski MS, Zasadny KR, Francis IR, Fenner MC, Ross CW, Milik AW, Estes J, Tuck M, Regan D, Fisher S, Glenn SD, Wahl RL: Iodine-131-anti-B1 radioimmunotherapy for B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 14:1974-81, 1996
9. Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C, Post J, Morard F, Vita N, Laurent P, Sun RX, Klein B, Dore JM: A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol* 94:318-23, 1996
10. Dore JM, Morard F, Vita N, Wijdenes J: Identification and location on syndecan-1 core protein of the epitopes of B-B2 and B-B4 monoclonal antibodies. *Febs Lett* 426:67-70, 1998
11. Clement C, Vooy WC, Klein B, Wijdeness J: B-B2 and B-B4, two new Moabs against secreting plasma cells. Proceedings of the Vth international workshop and conference on human leukocyte differentiation antigens. Oxford, 1995, p 174
12. Koda JE, Rapraeger A, Bernfield M: Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells. Cell surface proteoglycan as a receptor for interstitial collagens. *J Biol Chem* 260:8157-62, 1985
13. Ridley RC, Xiao H, Hata H, Woodliff J, Epstein J, Sanderson RD: Expression of syndecan regulates human myeloma plasma cell adhesion to type I collagen. *Blood* 81:767-74, 1993
14. Sanderson RD, Hinkes MT, Bernfield M: Syndecan-1, a cell-surface proteoglycan, changes in size and abundance when keratinocytes stratify. *J Invest Dermatol* 99:390-6, 1992
15. Saunders S, Bernfield M: Cell surface proteoglycan binds mouse mammary epithelial cells to fibronectin and behaves as a receptor for interstitial matrix. *J Cell Biol* 106:423-30, 1988
16. Sun X, Mosher DF, Rapraeger A: Heparan sulfate-mediated binding of epithelial cell surface proteoglycan to thrombospondin. *J Biol Chem* 264:2885-9, 1989
17. Sanderson RD, Lalor P, Bernfield M: B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul* 1:27-35, 1989
18. Witzig TE, Kimlinger T, Stenson M, Therneau T: Syndecan-1 expression on malignant cells from the blood and marrow of patients with plasma cell proliferative disorders and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 31:167-75, 1998
19. Jourdan M, Ferlin M, Legouffe E, Horvathova M, Liautard J, Rossi JF, Wijdenes J, Brochier J, Klein B: The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. *British Journal Of Haematology* 100:637-46, 1998
20. Borset M, Helseth E, Naume B, Waage A: Lack of IL-1 secretion from human myeloma cells highly purified by immunomagnetic separation. *Br J Haematol* 85:446-51, 1993
21. Seidel C, Sundan A, Hjorth M, Turesson I, Dahl IM, Abildgaard N, Waage A, Borset M: Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma. *Blood* 95:388-92, 2000
22. Costes V, Magen V, Legouffe E, Durand L, Baldet P, Rossi JF, Klein B, Brochier J: The Mi15 monoclonal antibody (anti-syndecan-1) is a reliable marker for quantifying plasma cells in paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens. *Hum Pathol* 30:1405-11, 1999
23. Couturier O, Faivre-Chauvet A, Filippovich IV, Thedrez P, Sai-Maurel C, Bardiès M, Mishra AK, Gauvrit M, Blain G, Apostolidis C, Molinet R, Abbé JC, Bataille R, Wijdenes J, Chatal JF, Chérel M: Validation of 213-Bi-alpha radioimmunotherapy for multiple myeloma. *Clinical Cancer Research* ,5,3165-3170, 1999
24. Supiot S, Faivre-Chauvet A, Couturier O, Heymann MF, Robillard N, Kraeber-Bodere F, Morandeau L, Mahe MA, Chérel M: Comparison of the biologic effects of MA5 and B-B4 monoclonal antibody labeled with iodine-131 and bismuth-213 on multiple myeloma. *Cancer* 94:1202-9., 2002
25. Orchard K, Cooper M, Wijdenes J, Mehta A, Borchardt P, QUadri S, green A, Baig S, Samson D, Buscombe J, Hilson A, Begent R, Prentice H: VII International Myeloma Workshop. Banff Springs Hotel. Banff Alberta Canada, 2001, p 178
26. Siegel JA, Thomas SR, Stubbs JB, Stabin MG, Hays MT, Koral KF, Robertson JS, Howell RW, Wessels BW, Fisher DR, Weber DA, Brill AB: MIRD Pamphlet No. 16: Techniques for quantitative radiopharmaceutical biodistribution data acquisition and analysis for use in human radiation dose estimates. *Journal of Nuclear Medicine* 40:37S-61S, 1999
27. Jaszczak RJ, Greer KL, Floyd CE, Jr., Harris CC, Coleman RE: Improved SPECT quantification using compensation for scattered photons. *J Nucl Med* 25:893-900., 1984
28. Buvat I, Benali H, Frouin F, Bazin JP, Di Paola R: Target apex-seeking in factor analysis of medical image sequences. *Physics in Medicine & Biology* 38:123-38, 1993

## Annexe IX

### FORMULAIRE D'INFORMATION AU PATIENT

**Titre de l'étude :** « ETUDE CLINIQUE DE PHASE I AVEC BÉNÉFICE INDIVIDUEL DIRECT DE RADIOIMMUNOTHERAPIE (RIT) DU MYELOME MULTIPLE UTILISANT L'ANTICORPS B-B4 MARQUE A L'IODE 131. »

Madame, Monsieur,

#### **Introduction :**

Vous êtes porteur d' une maladie chronique grave de la moelle osseuse appelée myélome multiple, caractérisée par la présence dans votre moelle de cellules (plasmocytes) anormales et l'excrétion dans votre sérum et/ou vos urines d'une protéine en quantité excessive appelée immunoglobuline monoclonale. Malgré un traitement réputé standard pouvant inclure du Velcade®, cette maladie n'a pas été contrôlée correctement.

A la surface de ces cellules anormales, une molécule appelée antigène (CD138) est présente. Nous vous proposons un nouveau mode de traitement, appelé radio-immunothérapie pour essayer d'éliminer ces plasmocytes. Cette radio-immunothérapie repose sur l'utilisation d'un anticorps qui portera la dose thérapeutique de radioactivité. Cet anticorps B-B4 reconnaît l'antigène CD138 sur les plasmocytes et, grâce à la radioactivité, il pourra les détruire.

Cet anticorps a déjà été administré à l'homme dans le cadre d'une étude de recherche clinique en Grande-Bretagne.

#### **Quel est le but de cette étude ?**

L'objectif de l'étude que nous vous proposons est de déterminer la dose la plus élevée de radioactivité à associer à l'anticorps pour obtenir une efficacité thérapeutique sans effet secondaire sévère. Le nombre total de malades qu'il est prévu d'inclure dans cet essai sera de 17 à 33.

Si vous acceptez de participer à l'étude, vous recevrez deux injections d'anticorps radioactif séparées d'une semaine. L'anticorps couplé à la substance radioactive, l'iode 131 est injecté par voie intraveineuse pendant 30 minutes environ.

#### **Première injection ou phase pré-thérapeutique.**

Il est nécessaire d'évaluer la manière dont l'anticorps va se répartir dans l'organisme, s'éliminer de l'organisme et se localiser spécifiquement sur la tumeur. Il est donc nécessaire, avant le traitement, de réaliser une étude de la distribution de l'anticorps dans l'organisme. Ceci est fait en couplant l'anticorps avec la même substance, l'iode 131 mais à faible dose, ce qui permet de repérer la radioactivité émise par l'anticorps.

Une petite quantité d'anticorps liée à de d'iode 131 sera injectée par voie intraveineuse pendant 15 minutes. Une série d'une dizaine de prélèvements de sang sera effectuée pour déterminer l'élimination de l'anticorps dans le sang sur une période de 7 jours. Sept scintigraphies (la première aura lieu 3 jours avant l'injection de l'anticorps) (examen d'imagerie comparable à une radiographie) dont la durée est d'environ 1 à 2 heures seront réalisées ensuite pendant une semaine pour déterminer la localisation de l'anticorps dans l'organisme et sur les cellules tumorales. Ces scintigraphies permettront de savoir si les cellules tumorales fixent bien l'anticorps radioactif et si vous pouvez ainsi être inclus(e) dans la phase de traitement proprement dite. On vous demandera également de conserver vos urines pendant 3 jours.

Si aucune localisation tumorale n'est vue en scintigraphie, vous ne pourrez recevoir le traitement dans le cadre de cette étude. Si la scintigraphie révèle une accumulation importante de l'anticorps dans un organe susceptible de présenter une toxicité à l'irradiation, vous ne pourrez pas recevoir le traitement. Cette première phase ne nécessite pas d'hospitalisation.

Environ 7 jours avant cette phase pré-thérapeutique, vous devrez commencer un traitement à base de Lugol afin de protéger votre thyroïde très sensible à la radioactivité. Ce traitement sera continué pendant 3 semaines après l'injection thérapeutique.

#### **2ème injection ou injection thérapeutique.**

Cette deuxième injection ne sera réalisée que si les résultats obtenus à la suite de la première injection sont satisfaisants. Dans le cas contraire, vous ne pourrez poursuivre l'étude et votre médecin vous proposera alors une autre alternative thérapeutique.

Si vous pouvez poursuivre l'étude, cette injection thérapeutique se déroulera 7 jours après la première injection. La dose d'iode 131 radioactif lié à d'anticorps injecté va varier par groupe de patients afin de déterminer la dose la plus élevée de radioactivité à associer à l'anticorps pour obtenir une efficacité thérapeutique sans effet secondaire sévère.

Tous les patients inclus dans cette étude ne seront donc pas traités avec la même radioactivité. Les premiers patients recevront une faible dose de radioactivité alors que les derniers patients recevront une dose de radioactivité plus élevée. Les risques d'effets secondaires seront plus élevés pour les fortes doses. Cependant toutes les doses se situent dans une zone que nous espérons efficace et pour laquelle la toxicité devrait être suivie et contrôlée par des traitements associés. Votre médecin vous précisera si votre participation à l'étude se situe au début, au milieu de l'étude ou bien à la fin. La date de votre traitement sera fixée par votre médecin et il pourra être amené à la modifier pour attendre les résultats des patients traités avant vous.

Après cette seconde injection vous serez hospitalisé(e) pendant 4 à 7 jours dans une chambre

individuelle, dite radio protégée, pour éviter l'exposition et l'irradiation de votre famille et les personnes de votre entourage à l'iode 131. Par mesure de radioprotection, vous ne pourrez pas recevoir des visites dans votre chambre. Votre hospitalisation sera terminée lorsque les mesures d'exposition réalisées pendant votre hospitalisation par le médecin seront en dessous d'un certain seuil. Des consignes de radioprotection adaptées à votre radioactivité vous seront données à la fin de votre hospitalisation.

Sept jours après cette seconde injection, vous effectuerez une scintigraphie. Vous aurez également deux prélèvements de sang (à J3 et J7) afin de mesurer la radioactivité de votre sang.

### **Examens et prélèvement à réaliser**

Si vous acceptez de participer à l'étude, un bilan complet (examen clinique, interrogatoire sur vos traitements antérieurs et en cours, examen sanguin, examen urinaire, scanner, éventuellement TEP) vous permettra de rentrer dans l'étude. L'examen sanguin consistera notamment en un dosage des globules blancs, des globules rouges, des plaquettes, des enzymes hépatiques, des dosages biochimiques, des marqueurs de votre maladie, des hormones thyroïdiennes. Dans le cadre de ce bilan, vous aurez une ponction de votre moelle osseuse. Cette ponction peut se faire sous anesthésie locale. Le bilan comprendra également un bilan cardiaque et respiratoire.

La plupart de ces évaluations interviendront dans les 4 semaines précédant l'inclusion.

Une partie du bilan biologique (Globules blancs, globules rouges, plaquettes, enzymes hépatiques, biochimie) sera répété juste avant chaque injection afin de confirmer votre inclusion dans l'étude.

Les femmes enceintes ne peuvent pas participer à cette étude clinique. Avant toute participation à cette étude, un test sanguin de grossesse sera réalisé chez les femmes en âge d'avoir des enfants.

Ce traitement devrait induire une baisse des globules blancs, des globules rouges, des plaquettes. Afin de prévenir les risques liés à ces diminutions, votre médecin peut avoir recours à la réinjection de cellules souches hématopoïétiques.

Si de telles cellules vous ont déjà été prélevées et si elles sont disponibles en quantité suffisante, elles pourront être utilisées dans le cadre de ce protocole.

Si la quantité n'est pas suffisante ou bien si vous n'avez jamais fait l'objet d'un tel prélèvement, il sera nécessaire de le faire. Ce prélèvement a lieu à l'Établissement Français du Sang, situé à proximité du CHU de Nantes. Des examens sanguins (sérologie) seront pratiqués avant ce prélèvement.

Les cellules souches, qui se trouvent habituellement dans la moelle osseuse, peuvent être recueillies dans le sang après l'injection pendant six jours par voie sous-cutanée une fois par jour d'un médicament appelé facteur de croissance de la moelle osseuse. Les cellules souche sont alors prélevées par cytophèrese. La cytophèrese consiste à établir un circuit fermé entre deux veines de vos bras et une centrifugeuse. Le sang quitte l'un de vos bras pour aller dans la centrifugeuse qui

va trier les cellules nécessaires, les conserver et laisser repartir les cellules non nécessaires pour la greffe vers votre autre bras. Chaque procédure de cytophèrese dure 3 à 4 heures pendant lesquelles vous serez allongé dans un lit ou un fauteuil. Ce prélèvement n'est pas douloureux et ne nécessite aucune prémédication. L'utilisation d'un anticoagulant à base de citrate n'entraîne pas de risque de saignement, mais peut occasionner une baisse de calcium dans le sang responsable d'une sensation de picotements, de fourmillements, voire de nausées ; l'administration de calcium dans la tubulure de retour permet de remédier à ce désagrément. Les cellules qui sont prélevées sont ensuite congelées et conservées dans des congélateurs selon des procédures très strictes. Lors de leur administration, elles sont décongelées et injectées par voie intraveineuse immédiatement après leur décongélation.

### **Quels sont les effets secondaires de ce nouveau traitement**

Des réactions allergiques telles que fièvre, frissons, nausées, vomissements ou démangeaisons peuvent survenir après les injections. Ces réactions sont rares dans notre expérience et disparaissent rapidement après un traitement anti-allergique adapté.

Le principal risque de l'administration d'un anticorps couplé à une substance radioactive est la toxicité de ce traitement sur la moelle osseuse qui abrite à l'état normal les globules blancs, les globules rouges et les plaquettes. Dans ces conditions, les risques sont une infection avec une baisse des globules blancs, une fatigue avec une baisse des globules rouges et des saignements avec une baisse des plaquettes. En cas d'anémie, des transfusions de globules rouges peuvent être nécessaires. En cas de manque de plaquettes, vous pourrez recevoir des transfusions de plaquettes. En cas de toxicité importante sur les globules blancs ou de toxicité globale importante, la réinjection de vos cellules souches hématopoïétiques peut s'avérer utile. Si une toxicité globulaire apparaissait, les cellules souches seraient ré-injectées après le traitement (6 à 14 jours). La ré-injection intraveineuse durera 2 à 4 heures. Les risques associés à cette procédure comprennent de la fièvre, des frissons, nausées, vomissements, infection, surcharge liquidienne, élévation temporaire de la tension artérielle et réaction allergique. Malgré la ré-injection des cellules souches, il existe un risque d'infection avec une baisse des globules blancs avant que la greffe de cellules souches ne soit pleinement fonctionnelle et il peut être nécessaire de vous hospitaliser pendant une période pouvant aller jusqu'à 4 semaines.

En outre, il peut apparaître une toxicité au niveau de votre thyroïde, vos poumons, foie, reins et autres organes vitaux, en raison de la dose d'irradiation élevée qui est envisagée. Cette éventualité est par ailleurs peu probable. Cette toxicité peut être irréversible avec, comme conséquence, une altération permanente de ces organes.

La méthode de préparation de l'anticorps proprement dit comporte une part de risque biologique non évaluable en raison de la présence théoriquement possible d'agents pathogènes

inconnus ou indétectables. Cependant, l'ensemble des précautions mises en œuvre nous conduit à considérer ce risque comme minime au regard du bénéfice attendu.

Le ministère de la santé (AFSSAPS) a donné son accord pour l'utilisation de cet anticorps. Il a déjà été utilisé dans un essai clinique en Grande-Bretagne sans constatation d'effets secondaires.

**Surveillance et suivi après traitement.**

Après le traitement, vous serez surveillé par des prises de sang deux fois par semaine pendant 6 semaines pour contrôler le nombre des cellules sanguines, puis à 3 mois, 6 mois et un an. Cette surveillance pourra s'intensifier en cas de toxicité si cela été nécessaire.

La surveillance de la fonction thyroïdienne sera effectuée par dosage de la TSH lors de ces prises de sang. La surveillance de la fonction pulmonaire et cardiaque sera effectuée en parallèle de ces bilans sanguins.

L'efficacité du traitement sera évaluée à partir de prises de sang et consultations réalisées à 4 semaines, 1 mois et demi puis tous les 3 mois pendant un an. Un contrôle par imagerie médicale sera réalisé un et 3 mois après le traitement

**Etes-vous obligé de participer ?**

Votre participation à cette étude est entièrement libre et volontaire. Votre médecin pourra anticiper la fin de votre participation à l'étude si vous ne répondez pas au traitement. Si vous décidez de ne pas participer, ou bien si une fois l'étude commencée, votre médecin ou vous-même souhaitez ne pas continuer, vous serez libre de la quitter sans avoir à fournir de motif, sans aucun préjudice et sans que cela nuise à la qualité de votre relation avec votre médecin. Votre médecin vous proposera l'alternative thérapeutique la plus appropriée et vous continuerez à bénéficier pleinement de sa compétence.

**TRAITEMENT DES DONNEES ET ASSURANCE**

Le fichier informatique utilisé pour réaliser la présente recherche a fait l'objet d'une demande d'autorisation à la CNIL (Commission Nationale Informatique et Libertés), en application des articles 40-1 et suivants de la loi « Informatique et Libertés ». Les données médicales vous concernant, ne seront transmises qu'au promoteur, et le cas échéant aux autorités de santé habilitées, dans des conditions garantissant leur confidentialité. Vous pourrez exercer vos droits d'accès et de rectification auprès de l'investigateur.

Le promoteur (Centre René Gauducheau) a souscrit une assurance spécifique pour l'essai. Ce protocole a par ailleurs été soumis au Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale (CCPPRB) n°2 des Pays de la Loire.

Votre participation à ce projet est librement consentie. Si vous deviez changer d'avis, vous pourriez interrompre votre participation à tout moment sans aucun préjudice quant à la qualité de votre prise en charge médicale.

**Annexe X**

**FORMULAIRE DE CONSENTEMENT DU PATIENT  
ETUDE CLINIQUE DE PHASE I AVEC BÉNÉFICE INDIVIDUEL DIRECT DE  
RADIOIMMUNOTHERAPIE (RIT) DU MYELOME MULTIPLE UTILISANT  
L'ANTICORPS B-B4 MARQUE A L'IODE 131.**

Nom et Prénom du Patient : \_\_\_\_\_

Date de naissance : \_\_\_\_\_

Adresse : \_\_\_\_\_

Je reconnais avoir reçu et lu le document "INFORMATION AU PATIENT" concernant le protocole sus-cité qui est un protocole de recherche.

J'ai pu obtenir du Dr. .... tous les renseignements complémentaires que je souhaitais.

Les informations recueillies durant cette étude, qui détermineront la dose la plus élevée du médicament radioactif pour une réduction des cellules de ma tumeur, resteront confidentielles. J'accepte toutefois que les résultats de cette étude puissent être publiés à visée médicale et scientifique pourvu que mon identité ne soit pas révélée. Je sais aussi que les représentants du promoteur et des Autorités de Santé auront un accès direct à mon dossier médical pour vérification des procédures et/ou des données de l'essai clinique, sans violer la confidentialité et dans les limites autorisées par les lois et réglementations. En signant la feuille de consentement éclairé j'autorise un tel accès à mon dossier médical.

Je participe librement à cette étude et je sais que je suis libre de retirer mon consentement et d'interrompre ma participation à cette étude à tout moment sans aucun préjudice concernant les soins que je peux recevoir.

Je sais qu'en cas de besoin et pendant tout le déroulement de cette étude, nous pouvons moi-même ou mon médecin traitant contacter l'un des médecins responsables du protocole, le Dr ..... au numéro suivant : .....

Le Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale n° 2 des Pays de Loire a émis un avis favorable le ..... concernant la mise en œuvre de cette étude clinique.

J'affirme vouloir participer au protocole sans aucune contrainte morale ou physique.

\_\_\_\_\_  
Signature du patient

\_\_\_\_\_  
Date

\_\_\_\_\_  
Signature du médecin

\_\_\_\_\_  
Date

## Annexe XI

## Fixation cellulaire et tissulaire de B-B4

Tableau I - Spécificité de l'anticorps B-B4

Lignées cellulaires	Type	Reconnaissance par le B-B4
RPMI 8226	Myélome multiple	+++
U266	Myélome multiple	+++
UM-1	Myélome multiple	+++
XG-1 à XG-9	Myélome multiple	+++
Daudi	Lymphome de Burkitt	-
Ramos	Lymphome de Burkitt	-
Jijoye	Lymphome de Burkitt	-
BJAB	Lymphome de Burkitt	-
Raji	Lymphome de Burkitt	-
BTL-1	Lignée lymphoblastoïde	-
BTL-6	Lignée lymphoblastoïde	-
KM-3	Lymphocyte pré-B	+
REH	Lymphocyte pré-B	-
NALM-6	Lymphocyte pré-B	+
ROS	Lymphocyte pré-B	-
697	Lymphocyte pré-B	-
CEM	Lymphocyte T	-
Jurkat	Lymphocyte T	-
HL60	Lignée myéloïde	-
U937	Lignée myéloïde	+
HEL	Lignée myéloïde	-
KG1A	Lignée myéloïde	-
K562	Lignée érythroïde	++

Tableau II - Analyse phénotypique de différentes lignées

Lignées cellulaires	CD38	CD138	Ig de surface		CD28	CD19	CD20	CD11 <sub>a</sub>	CD49 <sub>e</sub>
			k	l					
<b>Myélome multiple</b>									
XG-1	++	++	+/-	-	+	-	-	-	-
XG-2	++	+++	-	+/-	++	-	-	+	-
XG-6	-	+++	-	+/-	+	-	-	-	-
U266	-	+++	-	-	++	-	-	-	-
RPMI 8226	++	++	-	-	++	-	-	+/-	+
LP1	++	+++	-	-	+	-	-	-	-
L363	+	+++	-	-	++	-	-	-	-
OPM2	+	+++	-	-	+	-	-	-	-
NCI-H929	+++	+	+	-	+	-	-	-	-
<b>Lignées EBV+</b>									
ARH-77	-	+/-	++	-	+	+	++	+	+
IM9	-	+/-	+	-	-	++	+	+	+
HS-Sultan	++	+	+/-	-	-	++	+++	++	+
MC/CAR	+	+/-	-	+	-	++	+	+	+/-

**Tableau III** - Analyse par immunodosage sur tissu sain

	B-B4	KC4	MA5
<b>Rein</b>			
Epithelium tubes	(c)	<b>M</b>	<b>M</b>
Glomérules	0	0	0
Urothélium	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>M</b>
Muscle lisse Vaisseaux Hile	0	0	(c)
<b>Foie</b>			
Hépatocytes	<b>M</b>	0	0
Endothélium Sinusoïdal	0	0	0
Epithélium biliaire	<b>M</b>	0	<b>M</b>
<b>Poumon</b>			
Revêtement. alvéolaire	<b>M</b>	m + faible, focal	<b>M</b>
Epithélium bronchique	M	<b>M</b>	<b>M</b>
Vaisseaux	0	0	0
Glandes bronchiques	<b>M</b>	m (un peu)	<b>M</b>
<b>Duodénum</b>			
Epithélium des cryptes	<b>M</b>	(c+)	m ?
Glandes	<b>M</b>	(c+)	0
Lymphocytes du chorion	<b>M</b>	(c+)	0
Muscle lisse	0	(c+)	0
Vaisseaux	0	(c+)	0
<b>Coeur</b>			
Fibres	(c+++)	0	c faible

**M**: Marquage membranaire intense  
**c**: Marquage cytoplasmique

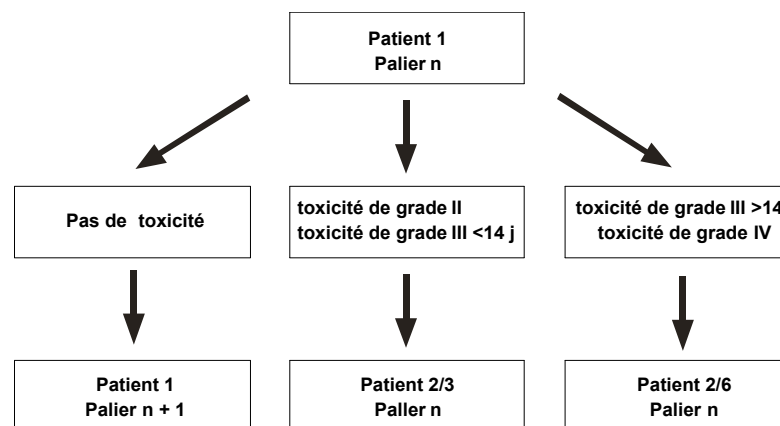
**Annexe XII**

**<sup>131</sup>I-B-B4 : escalade de dose**

**<sup>131</sup>I-B-B4 : escalade de dose, nombre minimal et maximal de patients**

Paliers	GBq/m <sup>2</sup>	mCi/m <sup>2</sup>	Diagramme (D = dose)	Nombre minimum de patients	Nombre de patients maximum envisagés
Palier 1 :	0,555	15	D	6 + 9	3
Palier 2 :	1,11	30	2D	2	3
Palier 3 :	1,83	49,5	3,3D		3
Palier 4 :	2,77	75	5D		3
Palier 5 :	3,88	105	7D		6+9
Palier 6 :	4,99	135	9D		6
				17	33

**Méthode de Faries (ou « Modified Continual Reassessment Method - MCRM »).**





## Liste des tableaux

Tableau 1 : principaux radioéléments émetteurs et leurs caractéristiques .....	13
Tableau 2 : Comparaison entre l'astate 211 émetteurs alpha et l'yttrium 90 émetteur bêta ....	17
Tableau 3 : Caractéristiques des lignées cellulaires de myélome .....	40
Tableau 4 : anticorps primaires utilisés dans la technique de western blot .....	48
Tableau 5:Caractéristiques des anticorps MA5 et B-B4 : analyse par cytométrie en flux de la reconnaissance de lignées de myélome multiple et de cellules humaines de myélome (A) et analyse histologique de la fixation sur tissus sains (B).....	61
Tableau 6 : Nombre de sites de fixation de l'anticorps B-B4.....	62
Tableau 7 : Diamètre moyen ( $\mu\text{M}$ ) des lignées de myélome multiple.....	75
Tableau 8 : Nombre d'atomes de bismuth 213 fixé sur chaque cellule de lignée cellulaire différente .....	76
Tableau 9 : Nombre d'atomes d'iode 131 fixés à la surface des cellules U266.....	76
Tableau 10 : concentrations des différentes chimiothérapies inhibant 50% de la prolifération cellulaire.....	81
Tableau 11 : combinaison du paclitaxel et de la RIT alpha après incubation de 2 heures (protocole 1) ou 24 h de paclitaxel (protocole 2) et calcul de l'indice de combinaison (IC) selon la méthode de Chou Talalay .....	84
Tableau 12 : Combinaison de la doxorubicine et de la RIT alpha après incubation de 2 heures (protocole 1) ou 24 h de chimiothérapie (protocole 2) et calcul de l'indice de combinaison (IC) selon la méthode de Chou Talalay .....	86
Tableau 13 : combinaison de la dexaméthasone et de la RIT alpha après incubation de 2 heures (protocole 1) ou 24 h de chimiothérapie (protocole 2) et calcul de l'indice de combinaison (IC) selon la méthode de Chou Talalay .....	88
Tableau 14 : Combinaison de la vinblastine et de la RIT alpha après incubation de 2 heures (protocole 1) ou 24 h de chimiothérapie (protocole 2) et calcul de l'indice de combinaison (IC) selon la méthode de Chou Talalay .....	90
Tableau 15 : Effets de la gemcitabine (GMZ) sur la prolifération, la survie clonogénique et le cycle cellulaire sur 3 lignées de myélome multiple.....	99
Tableau 16 : Rappel simplifié des activation protéiques de LP1 et U266 après irradiation gamma ou alpha.....	128

## Liste des figures

Figure 1 : représentation schématique des différentes formes de fragments d'anticorps préparés par digestion enzymatique ou ingénierie moléculaire. ....	8
Figure 2 : Schéma de décroissance de l'uranium 233 (d'après Couturier <sup>21</sup> ) .....	12
Figure 3 : Exemples d'approches de pré-ciblage (A) en deux-temps par avidine-biotine (B) en trois temps par avidine-biotine (C) à l'aide de préciblage par un anticorps bispécifique (D) à l'aide de préciblage par oligonucléotides (D'après Sharkey <sup>4</sup> ). ....	16
Figure 4 : a - parcours des particules alpha, de l'ordre de quelques diamètres cellulaires comparé avec b - parcours des particules bêta de l'ordre du millimètre (d'après Couturier <sup>21</sup> ). ....	18
Figure 5 : Représentation schématique de la trace d'une particule alpha (d'après Pouget <sup>47</sup> )...	21
Figure 6 : Les différentes voies de transduction impliquant RAS (d'après Dent <sup>59</sup> ).....	25
Figure 7 : Exemples de courbes de survie cellulaire après irradiation à haut et bas TEL (d'après Pouget <sup>47</sup> ). ....	29
Figure 8 : Cartes schématiques des différentes constructions .....	57
Figure 9 : courbes de Scatchard; LP1 (carré), RPMI 8226 (triangle) et U266 (rond) .....	62
Figure 10 : internalisation de l'anticorps B-B4 marqué à l'iode 131 sur les cellules U266. Le rapport entre l'activité intracytoplasmique (internalisée) et l'activité membranaire (fixée sur la cellule) a été calculé. ....	63
Figure 11: Prolifération cellulaire (test d'incorporation de thymidine tritiée) relative au témoin après 24 heures d'exposition à différents anticorps radiomarqués au bismuth 213 : B-B4 (carrés), MA5 (cercles) et anticorps non spécifique (astérisques) .....	64
Figure 12 : Arrêt des cellules dans la phase G2-M du cycle cellulaire pour des cellules U266 irradiées à différentes concentrations de <sup>213</sup> Bi-B-B4 à une activité spécifique de 400 MBq/mg : 10 nM (carrés), 5 nM (pointes de flèches), 2 nM (cercles pleins), 1 nM (losange), 0,5 nM (cercles vides) et anticorps froid (astérisques),.....	65
Figure 13 : Arrêt des cellules dans la phase G2-M du cycle cellulaire après irradiation à l'aide de différents anticorps marqués au bismuth 213 à une activité volumique variable : B-B4 à 200 MBq/l (carrés pleins), B-B4 à 40 MBq/l (ronds pleins), MA5 à 200 MBq/l (carrés vides), MA5 à 40 MBq/l (ronds vides) et anticorps non spécifique (astérisques) .....	66
Figure 14 : Effets sur l'activité métabolique (test au MTT) des cellules U266 après 24 heures d'irradiation à l'aide de l'anticorps B-B4 marqué à l'iode 131 (ronds) ou au bismuth 213 (carrés) .....	67
Figure 15 : Survie clonogénique des cellules U266 après 24 heures d'irradiation à l'aide de l'anticorps B-B4 marqué à l'iode 131 (ronds) ou au bismuth 213 (carrés) .....	68
Figure 16 : Blocage cellulaire dans la phase G2-M de cellules U266 irradiées à l'aide de l'anticorps B-B4 marqué : au Bismuth 213 à une activité ajoutée de 600 MBq/l (carrés pleins) et 240 MBq/l (ronds pleins) ou bien à l'Iode 131 à une activité ajoutée de 600 MBq/l (carrés vides) et 200 MBq/l (ronds vides) ou bien exposition des cellules à un anticorps non spécifique non radiomarqué (astérisque). ....	69
Figure 17: survie clonogénique de 3 lignées de myélome multiple ( LP1 : carré ; RPMI 8226 : triangle ; U266 : rond) après irradiation non spécifique avec la <sup>213</sup> Bi-BSA (formes vides) et spécifique par le <sup>213</sup> Bi-B-B4 (formes pleines) .....	70
Figure 18 : Survie clonogénique de 3 lignées de myélome multiple : LP1 (carré), RPMI 8226 (triangle), U266 (rond).....	71
Figure 19 : prolifération cellulaire (test d'incorporation de thymidine tritiée) de 3 lignées de myélome multiple : LP1 (carré), RPMI 8226 (triangle), U266 (rond).....	72

Figure 20 : pourcentage cellules bloquées dans la phase G2-M du cycle cellulaire (marquage à l'iodure de propidium) en fonction de la concentration en anticorps radiomarqué à une activité spécifique de 4 mCi/mg de 3 lignées de myélome multiple : LP1 (carré), RPMI 8226 (triangle), U266 (rond).....	73
Figure 21: Apoptose (marquage à l'anticorps APO2,7) en fonction de la concentration en anticorps radiomarqué à une activité spécifique de 4 mCi/mg de 3 lignées de myélome multiple : LP1 (carré), RPMI 8226 (triangle), U266 (rond) .....	74
Figure 22 : Courbes de survie clonogénique après correction dosimétrique après traitement par RIT alpha ( <sup>213</sup> Bi-B-B4) et irradiation gamma : LP1 (carré), RPMI 8226 (triangle) et U266 (rond).....	77
Figure 23 : Prolifération cellulaire (test d'incorporation de thymidine tritiée) 24 heures après irradiation gamma (carrés vides) et irradiation alpha (carrés pleins).....	78
Figure 24 : Apoptose (marquage à l'anticorps anti- apo 2.7 et analyse en cytométrie en flux) après irradiation gamma et irradiation alpha : LP1 (carré), RPMI 8226 (triangle) U266 (rond). .....	79
Figure 25 : Prolifération cellulaire (incorporation de thymidine tritiée) en fonction de la concentration en chimiothérapie pour 3 lignées de myélome multiple LP1 (carrés), RPMI 8226 (triangle pointe en haut), U266 (triangle pointe en bas) .....	82
Figure 26 : survie clonogénique après traitement par RIT alpha à une activité spécifique de 4 mCi/mg (carrés vides) ou RIT alpha combiné à 1 nM de paclitaxel (carrés pleins). Activité spécifique de 96 MBq/m pour LP1, 150 MBq/mg pour RPMI 8226, et 120 MBq/mg pour U266.....	85
<i>Figure 27 : survie clonogénique après traitement par RIT alpha à une activité spécifique de 4 mCi/mg (carrés vides) ou RIT alpha combiné à 10 nM de doxorubicine (carrés pleins). Activité spécifique de 96 MBq/m pour LP1, 150 MBq/mg pour RPMI 8226, et U266.</i>	87
Figure 28 : Effets de la doxorubicine et du paclitaxel sur le cycle cellulaire (pourcentage de cellules en phase G2-M après marquage à iodure de propidium); lignées cellulaires LP1 (carrés), RPMI 8226 (triangle), U266 (rond).....	93
Figure 29 : Effets de vinblastine sur le cycle cellulaire après marquage à iodure de propidium : cellules en phase G1 (carré), S (triangle point en haut) et G2-M (triangle pointe en bas) .....	94
Figure 30: effets de la doxorubicine combinée à la RIT alpha sur les cassures de l'ADN (mesure du relative Tail DNA content par la techniques des comètes).....	96
Figure 31 : effets de la doxorubicine et du paclitaxel combinés à la RIT alpha sur l'apoptose (mesure par cytométrie en flux du pourcentage de cellules marquées par l'anticorps apo 2.7).....	97
Figure 32 : A : prolifération cellulaire (test d'incorporation de thymidine tritiée) et B : modification du cycle cellulaire (analyse en cytométrie en flux après incorporation d'iodure de propidium) après exposition à différentes concentrations de gemcitabine ...	99
Figure 33 : survie clonogénique après irradiation gamma (A) ou alpha (B), seule (carrés pleins) ou irradiation combinée à 10 nM de gemcitabine ( carrés vides).....	100
Figure 34 : apoptose après traitement par gemcitabine, irradiation alpha, irradiation gamma ou leur combinaison (marquage en cytométrie de flux à l'aide de l'anticorps apo 2.7) .....	102
Figure 35 : Lignée LP1 - A - Étude par Western-Blot de la phosphorylation des protéines ERK 1/2, p38, AKT et RAF-1 après irradiation gamma à 4 Gy (carré) ou 12 Gy (triangle). - B – Courbes obtenues après quantification à l'aide du logiciel ImageJ rapportée à l'actine. ....	105
Figure 36 : Lignée U266 - A- Étude par Western-Blot de la phosphorylation des protéines ERK 1/2, p38, AKT et RAF-1 après irradiation gamma à 4 Gy (carré) ou 12 Gy	

(triangle). - B - Courbes obtenues après quantification à l'aide du logiciel ImageJ rapportée à l'actine. ....	107
Figure 37 : Lignée LP1 - A - Étude par Western-Blot de la phosphorylation des protéines ERK 1/2, p38, AKT et RAF-1 après irradiation alpha ( $^{213}\text{Bi-B-B4}$ à 2 nM) à la dose de 0,7Gy (carré) ou 4 Gy (triangle). - B - Courbes obtenues après quantification à l'aide du logiciel ImageJ rapportée à l'actine.....	109
Figure 38 : Lignée U266 - A - Étude par Western-Blot de la phosphorylation des protéines ERK 1/2, p38, AKT et RAF-1 après irradiation alpha ( $^{213}\text{Bi-B-B4}$ à 2 nM) à la dose de 1,3 Gy (carré) ou 5,2 Gy (triangle). - B - Courbes obtenues après quantification à l'aide du logiciel ImageJ rapportée à l'actine. ....	111
Figure 39 : Produit d'amplification obtenus après RT-PCR sur les cellules U266 transfectées avec le plasmide pEGFP-C3-K-Ras 4B. Le fragment amplifié correspond au fragment inséré dans le vecteur d'expression pEGFP-C3. ....	112
Figure 40 : Prolifération cellulaire (test d'incorporation de thymidine tritiée) 24 heures après irradiation gamma (A) ou RIT alpha (B) des cellules U266 (carrés pleins) et U266-K-Ras 4B (carrés vides). ....	113

## 11 Bibliographie

1. Kaminski MS, Zasadny KR, Francis IR, et al. Radioimmunotherapy of B-cell lymphoma with [131I]anti-B1 (anti-CD20) antibody. *N Engl J Med*. 1993;329:459-465.
2. Press OW, Eary JF, Appelbaum FR, et al. Radiolabeled-antibody therapy of Bcell lymphoma with autologous bone marrow support. *N Engl J Med*. 1993;329:1219–1224.
3. Kaminski MS, Tuck M, Estes J, et al. 131I-tositumomab therapy as initial treatment for follicular lymphoma. *N Engl J Med*. 2005;352:441-449.
4. Sharkey RM, Goldenberg DM. Perspectives on cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies. *J Nucl Med*. 2005;46 Suppl 1:115S-127S.
5. Britz-Cunningham SH, Adelstein SJ. Molecular targeting with radionuclides: state of the science. *J Nucl Med*. 2003;44:1945-1961.
6. DeNardo SJ, DeNardo GL, O'Grady LF, et al. Treatment of B cell malignancies with 131I Lym-1 monoclonal antibodies. *Int J Cancer Suppl*. 1988;3:96-101.
7. Kaminski MS, Fig LM, Zasadny KR, et al. Imaging, dosimetry, and radioimmunotherapy with iodine 131-labeled anti-CD37 antibody in B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 1992;10:1696-1711.
8. Kaminski MS, Estes J, Zasadny KR, et al. Radioimmunotherapy with iodine (131I) tositumomab for relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: updated results and long-term follow-up of the University of Michigan experience  
Imaging, dosimetry, and radioimmunotherapy with iodine 131-labeled anti-CD37 antibody in B-cell lymphoma. *Blood*. 2000;96:1259-1266.
9. Witzig TE, Flinn IW, Gordon LI, et al. Treatment with ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy in patients with rituximab-refractory follicular non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2002;20:3262-3269.
10. Witzig TE, White CA, Wiseman GA, et al. Phase I/II trial of IDEC-Y2B8 radioimmunotherapy for treatment of relapsed or refractory CD20(+) B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 1999;17:3793-3803.

11. Chatal J-F, Mahé M. Therapeutic use of radiolabeled antibodies. In Murray IPC, Ell PJ, eds Nuclear Medicine in clinical diagnosis and treatment Edinburgh : Churchill Livingstone. 1998.
12. Goldenberg DM. Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies. J Nucl Med. 2002;43:693-713.
13. Mahe M, Chatal JF. [Radioimmunotherapy in the treatment of cancers]. Bull Cancer. 1994;81:788-799.
14. Vuillez JP, Kraeber-Bodere F, Moro D, et al. Radioimmunotherapy of small cell lung carcinoma with the two-step method using a bispecific anti-carcinoembryonic antigen/anti-diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) antibody and iodine-131 Di-DTPA hapten: results of a phase I/II trial. Clin Cancer Res. 1999;5:3259s-3267s.
15. Alvarez RD, Huh WK, Khazaeli MB, et al. A Phase I study of combined modality (90)Yttrium-CC49 intraperitoneal radioimmunotherapy for ovarian cancer. Clin Cancer Res. 2002;8:2806-2811.
16. Mahe MA, Fumoleau P, Fabbro M, et al. A phase II study of intraperitoneal radioimmunotherapy with iodine-131-labeled monoclonal antibody OC-125 in patients with residual ovarian carcinoma. Clin Cancer Res. 1999;5:3249s-3253s.
17. Kraeber-Bodere F, Bardet S, Hoefnagel CA, et al. Radioimmunotherapy in medullary thyroid cancer using bispecific antibody and iodine 131-labeled bivalent hapten: preliminary results of a phase I/II clinical trial  
Toxicity and efficacy of radioimmunotherapy in carcinoembryonic antigen-producing medullary thyroid cancer xenograft: comparison of iodine 131-labeled F(ab')<sub>2</sub> and pretargeted bivalent hapten and evaluation of repeated injections  
Bispecific antibody and bivalent hapten radioimmunotherapy in CEA-producing medullary thyroid cancer xenograft. Clin Cancer Res. 1999;5:3190s-3198s.
18. Kraeber-Bodere F, Faivre-Chauvet A, Sai-Maurel C, et al. Bispecific antibody and bivalent hapten radioimmunotherapy in CEA-producing medullary thyroid cancer xenograft. J Nucl Med. 1999;40:198-204.
19. Kraeber-Bodere F, Faivre-Chauvet A, Sai-Maurel C, et al. Toxicity and efficacy of radioimmunotherapy in carcinoembryonic antigen-producing medullary thyroid cancer xenograft: comparison of iodine 131-labeled F(ab')<sub>2</sub> and pretargeted bivalent hapten and evaluation of repeated injections. Clin Cancer Res. 1999;5:3183s-3189s.
20. Regaud C, A. L. La radiosensibilité cellulaire étudiée dans l'ensemble de ses manifestations. Radiophysiol Radiother. 1927;1:95-116.

21. Couturier O, Supiot S, Degraef-Mougin M, et al. Cancer radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2005;32:601-614.
22. Mulford DA, Scheinberg DA, Jurcic JG. The promise of targeted {alpha}-particle therapy. *J Nucl Med*. 2005;46 Suppl 1:199S-204S.
23. Yao Z, Garmestani K, Wong KJ, et al. Comparative cellular catabolism and retention of astatine-, bismuth-, and lead-radiolabeled internalizing monoclonal antibody. *J Nucl Med*. 2001;42:1538-1544.
24. Kozak RW, Atcher RW, Gansow OA, Friedman AM, Hines JJ, Waldmann TA. Bismuth-212-labeled anti-Tac monoclonal antibody: alpha-particle-emitting radionuclides as modalities for radioimmunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:474-478.
25. Brechbiel MW, Gansow OA. Synthesis of C-Functionalized *trans*-Cyclohexyldiethylenetriaminepenta-acetic acid for Labelling of monoclonal antibodies with the bismuth-212 alpha-particle emitter. *J Chem Soc Perkin Trans*. 1992;1:1173-1178.
26. Jurcic JG, Larson SM, Sgouros G, et al. Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. *Blood*. 2002;100:1233-1239.
27. McDevitt MR, Ma D, Lai LT, et al. Tumor therapy with targeted atomic nanogenerators. *Science*. 2001;294:1537-1540.
28. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001;344:783-792.
29. Macklis R, Kinsey B, Kassis A, et al. Radioimmunotherapy with alpha-particle-emitting immunoconjugates. *Science*. 1988;240.
30. Simonson RB, Ultee ME, Hauler JA, Alvarez VL. Radioimmunotherapy of peritoneal human colon cancer xenografts with site-specifically modified 212Bi-labeled antibody. *Cancer Res*. 1990;50:985s-988s.
31. Huneke RB, Pippin CG, Sq, Brechbiel MW, Gansow OA, Strand M. Effective alpha-particle-mediated radioimmunotherapy of murine leukemia. *Cancer Res*. 1992;52:5818-5820.
32. Hartmann F, Horak EM, Garmestani K, et al. Radioimmunotherapy of nude mice bearing a human interleukin 2 receptor alpha-expressing lymphoma utilizing the alpha-emitting radionuclide- conjugated monoclonal antibody 212Bi-anti-Tac. *Cancer Res*. 1994;54:4362-4370.

33. Kennel SJ, Stabin M, Roeske JC, et al. Radiotoxicity of bismuth-213 bound to membranes of monolayer and spheroid cultures of tumor cells. *Radiat Res.* 1999;151:244-256.
34. Ballangrud AM, Yang WH, Charlton DE, et al. Response of LNCaP spheroids after treatment with an alpha-particle emitter (<sup>213</sup>Bi)-labeled anti-prostate-specific membrane antigen antibody (J591). *Cancer Res.* 2001;61:2008-2014.
35. Sandmaier BM, Bethge WA, Wilbur DS, et al. Bismuth 213-labeled anti-CD45 radioimmunoconjugate to condition dogs for nonmyeloablative allogeneic marrow grafts. *Blood.* 2002;100:318-326.
36. Bethge WA, Wilbur DS, Storb R, et al. Radioimmunotherapy with bismuth-213 as conditioning for nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation in dogs: a dose deescalation study. *Transplantation.* 2004;78:352-359.
37. Axworthy DB, Reno JM, Hylarides MD, et al. Cure of human carcinoma xenografts by a single dose of pretargeted yttrium-90 with negligible toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:1802-1807.
38. Zhang M, Yao Z, Garmestani K, et al. Pretargeting radioimmunotherapy of a murine model of adult T-cell leukemia with the alpha-emitting radionuclide, bismuth 213. *Blood.* 2002;100:208-216.
39. Zhang M, Zhang Z, Garmestani K, et al. Pretarget radiotherapy with an anti-CD25 antibody-streptavidin fusion protein was effective in therapy of leukemia/lymphoma xenografts
- Radioimmunotherapy of A431 xenografted mice with pretargeted B3 antibody-streptavidin and (<sup>90</sup>Y)-labeled 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA)-biotin
- Pretargeting radioimmunotherapy of a murine model of adult T-cell leukemia with the alpha-emitting radionuclide, bismuth 213
- Vascular-targeted radioimmunotherapy with the alpha-particle emitter <sup>211</sup>At. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:1891-1895.
40. Adams GP, Shaller CC, Chappell LL, et al. Delivery of the alpha-emitting radioisotope bismuth-213 to solid tumors via single-chain Fv and diabody molecules. *Nucl Med Biol.* 2000;27:339-346.
41. Hall EJ. *Radiobiology for the radiologist.* Philadelphia : Lippincott. 1994:153-164.



42. Carlin S, Akabani G, Zalutsky MR. In vitro cytotoxicity of (211)at-astatide and (131)I-iodide to glioma tumor cells expressing the sodium/iodide symporter. *J Nucl Med.* 2003;44:1827-1838.
43. Humm JL. A microdosimetric model of astatine-211 labeled antibodies for radioimmunotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1987;13:1767-1773.
44. Bloomer WD, McLaughlin WH, Lambrecht RM, et al. 211At radiocolloid therapy: further observations and comparison with radiocolloids of 32P, 165Dy, and 90Y. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1984;10:341-348.
45. Behr TM, Behe M, Stabin MG, et al. High-linear energy transfer (LET) alpha versus low-LET beta emitters in radioimmunotherapy of solid tumors: therapeutic efficacy and dose-limiting toxicity of 213Bi- versus 90Y-labeled CO17-1A Fab' fragments in a human colonic cancer model. *Cancer Res.* 1999;59:2635-2643.
46. Nikjoo H, Uehara S, Wilson WE, Hoshi M, Goodhead DT. Track structure in radiation biology: theory and applications. *Int J Radiat Biol.* 1998;73:355-364.
47. Pouget JP, Mather SJ. General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation. *European Journal of Nuclear Medicine.* 2001;28:541-561.
48. Humm JL, Roeske JC, Fisher DR, Chen GT. Microdosimetric concepts in radioimmunotherapy. *Med Phys.* 1993;20:535-541.
49. Stinchcomb TG, Roeske JC. Analytic microdosimetry for radioimmunotherapeutic alpha emitters. *Med Phys.* 1992;19:1385-1393.
50. Wu LJ, Randers-Pehrson G, Xu A, et al. Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:4959-4964.
51. Narayanan PK, Goodwin EH, Lehnert BE. Alpha particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells. *Cancer Res.* 1997;57:3963-3971.
52. Iyer R, Lehnert BE. Effects of ionizing radiation in targeted and nontargeted cells. *Arch Biochem Biophys.* 2000;376:14-25.
53. Munro TR. The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. *Radiat Res.* 1970;42:451-470.
54. Radford IR. Evidence for a general relationship between the induced level of DNA double-strand breakage and cell-killing after X-irradiation of mammalian cells. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1986;49:611-620.

55. Goodhead DT. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int J Radiat Biol.* 1994;65:7-17.
56. Jenner TJ, deLara CM, O'Neill P, Stevens DL. Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in V79-4 mammalian cells following gamma- and alpha-irradiation. *Int J Radiat Biol.* 1993;64:265-273.
57. Kampf G. Induction of DNA double-strand breaks by ionizing radiation of different quality and their relevance for cell inactivation. *Radiobiol Radiother (Berl).* 1988;29:631-658.
58. Ward JF. Some biochemical consequences of the spatial distribution of ionizing radiation-produced free radicals. *Radiat Res.* 1981;86:185-195.
59. Dent P, Yacoub A, Fisher PB, Hagan MP, Grant S. MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene.* 2003;22:5885-5896.
60. Lewanski CR, Gullick WJ. Radiotherapy and cellular signalling. *Lancet Oncol.* 2001;2:366-370.
61. Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, et al. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med.* 1994;180:525-535.
62. Verheij M, Bose R, Lin XH, et al. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature.* 1996;380:75-79.
63. Chmura SJ, Nodzenski E, Kharbanda S, et al. Down-regulation of ceramide production abrogates ionizing radiation-induced cytochrome c release and apoptosis. *Mol Pharmacol.* 2000;57:792-796.
64. Chmura SJ, Nodzenski E, Beckett MA, Kufe DW, Quintans J, Weichselbaum RR. Loss of ceramide production confers resistance to radiation-induced apoptosis. *Cancer Res.* 1997;57:1270-1275.
65. Michael JM, Lavin MF, Watters DJ. Resistance to radiation-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma cells is associated with defective ceramide signaling. *Cancer Res.* 1997;57:3600-3605.
66. Choy E, Chiu VK, Silletti J, et al. Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell.* 1999;98:69-80.
67. Bezieau S, Devilder MC, Avet-Loiseau H, et al. High incidence of N and K-Ras activating mutations in multiple myeloma and primary plasma cell leukemia at diagnosis. *Human Mutation.* 2001;18:212-224.

68. Beaupre DM, McCafferty-Grad J, Bahlis NJ, Boise LH, Lichtenheld MG. Farnesyl transferase inhibitors enhance death receptor signals and induce apoptosis in multiple myeloma cells. *Leuk Lymphoma*. 2003;44:2123-2134.
69. Ochiai N, Uchida R, Fuchida S, et al. Effect of farnesyl transferase inhibitor R115777 on the growth of fresh and cloned myeloma cells in vitro. *Blood*. 2003;102:3349-3353. Epub 2003 Jul 3343.
70. Le Gouill S, Pellat-Deceunynck C, Harousseau JL, et al. Farnesyl transferase inhibitor R115777 induces apoptosis of human myeloma cells. *Leukemia*. 2002;16:1664-1667.
71. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:11-22.
72. Plataniias LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood*. 2003;101:4667-4679. Epub 2003 Mar 4666.
73. Ogata A, Chauhan D, Teoh G, et al. IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J Immunol*. 1997;159:2212-2221.
74. Hu L, Shi Y, Hsu JH, Gera J, Van Ness B, Lichtenstein A. Downstream effectors of oncogenic ras in multiple myeloma cells. *Blood*. 2003;101:3126-3135. Epub 2002 Dec 3119.
75. Hideshima T, Akiyama M, Hayashi T, et al. Targeting p38 MAPK inhibits multiple myeloma cell growth in the bone marrow milieu. *Blood*. 2003;101:703-705. Epub 2002 Sep 2005.
76. Chen YR, Wang X, Templeton D, Davis RJ, Tan TH. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J Biol Chem*. 1996;271:31929-31936.
77. Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*. 2004;23:2838-2849.
78. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999;96:857-868.
79. Tu Y, Gardner A, Lichtenstein A. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase pathway in multiple myeloma plasma cells: roles in cytokine-dependent survival and proliferative responses. *Cancer Res*. 2000;60:6763-6770.

80. Pene F, Claessens YE, Muller O, et al. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Oncogene*. 2002;21:6587-6597.
81. Grana TM, Rusyn EV, Zhou H, et al. Ras mediates radioresistance through both phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and Raf-dependent but mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase-independent signaling pathways  
The Ras radiation resistance pathway. *Cancer Res*. 2002;62:4142-4150.
82. Choi JA, Park MT, Kang CM, et al. Opposite effects of Ha-Ras and Ki-Ras on radiation-induced apoptosis via differential activation of PI3K/Akt and Rac/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Oncogene*. 2004;23:9-20.
83. Sklar MD. The ras oncogenes increase the intrinsic resistance of NIH 3T3 cells to ionizing radiation. *Science*. 1988;239:645-647.
84. Pirollo KF, Hao Z, Rait A, Ho CW, Chang EH. Evidence supporting a signal transduction pathway leading to the radiation-resistant phenotype in human tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;230:196-201.
85. Bernhard EJ, Stanbridge EJ, Gupta S, et al. Direct evidence for the contribution of activated N-ras and K-ras oncogenes to increased intrinsic radiation resistance in human tumor cell lines. *Cancer Res*. 2000;60:6597-6600.
86. Gupta AK, Bakanauskas VJ, Cerniglia GJ, et al. The Ras radiation resistance pathway. *Cancer Res*. 2001;61:4278-4282.
87. McKenna WG, Muschel RJ, Gupta AK, Hahn SM, Bernhard EJ. The RAS signal transduction pathway and its role in radiation sensitivity. *Oncogene*. 2003;22:5866-5875.
88. Hennequin C, Favaudon V. Biological basis for chemo-radiotherapy interactions. *Eur J Cancer*. 2002;38:223-230.
89. Sinclair WK, Morton RA. X-ray sensitivity during the cell generation cycle of cultured Chinese hamster cells. *Radiat Res*. 1966;29:450-474.
90. Withers HR, Mason K, Reid BO, et al. Response of mouse intestine to neutrons and gamma rays in relation to dose fractionation and division cycle. *Cancer*. 1974;34:39-47.
91. Tishler RB, Geard CR, Hall EJ, Schiff PB. Taxol sensitizes human astrocytoma cells to radiation. *Cancer Res*. 1992;52:3495-3497.
92. Liebmann J, Cook JA, Fisher J, Teague D, Mitchell JB. In vitro studies of Taxol as a radiation sensitizer in human tumor cells. *Journal of the National Cancer Institute*. 1994;86:441-446.

93. Hennequin C, Giocanti N, Favaudon V. Interaction of ionizing radiation with paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere) in HeLa and SQ20B cells. *Cancer Res.* 1996;56:1842-1850.
94. Schiff PB, Horwitz SB. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1980;77:1561-1565.
95. Schmidt-Ullrich RK, Mikkelsen RB, Dent P, et al. Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. *Oncogene.* 1997;15:1191-1197.
96. Barendsen GW, Koot CJ, Van Kersen GR, Bewley DK, Field SB, Parnell CJ. The effect of oxygen on impairment of the proliferative capacity of human cells in culture by ionizing radiations of different LET. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1966;10:317-327.
97. Fowler JF. Radiobiological aspects of low dose rates in radioimmunotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1990;18:1261-1269.
98. Steel GG, Deacon JM, Duchesne GM, Horwich A, Kelland LR, Peacock JH. The dose-rate effect in human tumour cells. *Radiother Oncol.* 1987;9:299-310.
99. Mitchell JB, Bedford JS, Bailey SM. Dose-rate effects in mammalian cells in culture III. Comparison of cell killing and cell proliferation during continuous irradiation for six different cell lines. *Radiat Res.* 1979;79:537-551.
100. Kal HB, Barendsen GW, Hauwe RB, Roelse H. Increased radiosensitivity of rat rhabdomyosarcoma cells induced by protracted irradiation. *Radiat Res.* 1975;63:521-530.
101. van Oostrum IE, Erkens-Schulze S, Petterson M, Wils IS, Rutgers DH. The relationship between radiosensitivity and cell kinetic effects after low- and high-dose-rate irradiation in five human tumors in nude mice. *Radiat Res.* 1990;122:252-261.
102. Ning S, Knox SJ. G2/M-phase arrest and death by apoptosis of HL60 cells irradiated with exponentially decreasing low-dose-rate gamma radiation. *Radiat Res.* 1999;151:659-669.
103. Knox SJ, Sutherland W, Goris ML. Correlation of tumor sensitivity to low-dose-rate irradiation with G2/M-phase block and other radiobiological parameters. *Radiat Res.* 1993;135:24-31.
104. Macklis RM, Beresford BA, Palayoor S, Sweeney S, Humm JL. Cell cycle alterations, apoptosis, and response to low-dose-rate radioimmunotherapy in lymphoma cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1993;27:643-650.

105. Gadbois DM, Crissman HA, Nastasi A, et al. Alterations in the progression of cells through the cell cycle after exposure to alpha particles or gamma rays. *Radiat Res.* 1996;146:414-424.
106. Woloschak GE, Chang-Liu CM. Differential modulation of specific gene expression following high- and low-LET radiations. *Radiat Res.* 1990;124:183-187.
107. Spiro IJ, Ling CC, Stickler R, Gaskill J. Oxygen radiosensitisation at low dose rate. *Br J Radiol.* 1985;58:357-363.
108. Ling CC, Spiro IJ, Mitchell J, Stickler R. The variation of OER with dose rate. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1985;11:1367-1373.
109. Langmuir VK, Mendonca HL. The combined use of <sup>131</sup>I-labeled antibody and the hypoxic cytotoxin SR 4233 in vitro and in vivo. *Radiat Res.* 1992;132:351-358.
110. Wilder RB, McGann JK, Sutherland WR, et al. The hypoxic cytotoxin SR 4233 increases the effectiveness of radioimmunotherapy in mice with human non-Hodgkin's lymphoma xenografts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1994;28:119-126.
111. Pedley RB, Begent RH, Boden JA, Boden R, Adam T, Bagshawe KD. The effect of radiosensitizers on radio-immunotherapy, using <sup>131</sup>I-labelled anti-CEA antibodies in a human colonic xenograft model. *Int J Cancer.* 1991;47:597-602.
112. Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C, et al. A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *British Journal of Haematology.* 1996;94:318-323.
113. Bataille R, Harousseau JL. Multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine.* 1997;336:1657-1664.
114. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2004;351:1860-1873.
115. Harousseau JL, Shaughnessy J, Jr., Richardson P. Multiple myeloma. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program).* 2004:237-256.
116. Harousseau JL. Stem cell transplantation in multiple myeloma (0, 1, or 2). *Curr Opin Oncol.* 2005;17:93-98.
117. Gahrton G, Tura S, Ljungman P, et al. Prognostic factors in allogeneic bone marrow transplantation for multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 1995;13:1312-1322.
118. Bjorkstrand BB, Ljungman P, Svensson H, et al. Allogeneic bone marrow transplantation versus autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: a retrospective case-matched study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood.* 1996;88:4711-4718.

119. Alexanian R, Haut A, Khan AU, et al. Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *Jama*. 1969;208:1680-1685.
120. Alexanian R, Dimopoulos MA, Delasalle K, Barlogie B. Primary dexamethasone treatment of multiple myeloma. *Blood*. 1992;80:887-890.
121. Alexanian R, Dimopoulos M. The treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med*. 1994;330:484-489.
122. Salmon SE, Crowley JJ, et al. e. Combination chemotherapy, glucocorticoids, and interferon alfa in the treatment of multiple myeloma: a Southwest Oncology Group study [see comments]. *Journal Of Clinical Oncology*. 1994;12:2405-2414.
123. Samson D, Gaminara E, et al. e. Infusion of vincristine and doxorubicin with oral dexamethasone as first-line therapy for multiple myeloma [see comments]. *Lancet*. 1989;2:882-885.
124. Yakoub-Agha I, Moreau P, Leyvraz S, et al. Thalidomide in patients with advanced multiple myeloma. *Hematol J*. 2000;1:186-189.
125. Singhal S, Mehta J, Desikan R, et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*. 1999;341:1565-1571.
126. Desikan RK, Jagannath S. Therapeutic dilemmas with thalidomide in multiple myeloma: case discussions. *Semin Oncol*. 2001;28:593-596.
127. Desikan R, Munshi N, Zeldis J, et al. e. Activity of thalidomide in multiple myeloma confirmed in 180 patients with active disease. *Blood*. 1999;94:603a.
128. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med*. 2003;348:2609-2617.
129. Clement C, Vooy WC, Klein B, Wijdenes J. B-B2 and B-B4, two new Moabs against secreting plasma cells. Proceedings of the Vth international workshop and conference on human leukocyte differentiation antigens. Oxford: Oxford University Press.; 1995.
130. Dore JM, Morard F, et al. e. Identification and location on syndecan-1 core protein of the epitopes of B-B2 and B-B4 monoclonal antibodies. *Febs Lett*. 1998;426:67-70.
131. Vooijs WC, Post J, Wijdenes J, et al. Efficacy and toxicity of plasma-cell-reactive monoclonal antibodies B-B2 and B-B4 and their immunotoxins. *Cancer Immunol Immunother*. 1996;42:319-328.
132. Gattei V, Godeas C, Degan M, Rossi FM, Aldinucci D, Pinto A. Characterization of anti-CD138 monoclonal antibodies as tools for investigating the

molecular polymorphism of syndecan-1 in human lymphoma cells. *Br J Haematol.* 1999;104:152-162.

133. Robillard N, Avet-Loiseau H, Garand R, et al. CD20 is associated with a small mature plasma cell morphology and t(11;14) in multiple myeloma. *Blood.* 2003;102:1070-1071.

134. Robillard N, Pellat-Deceunynck C, Bataille R. Phenotypic characterization of the human myeloma cell growth fraction. *Blood.* 2005;105:4845-4848.

135. Burton J, Mishina D, Cardillo T, et al. Epithelial mucin-1 (MUC1) expression and MA5 anti-MUC1 monoclonal antibody targeting in multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 1999;5:3065s-3072s.

136. Treon SP, Mollick JA, Urashima M, et al. Muc-1 core protein is expressed on multiple myeloma cells and is induced by dexamethasone. *Blood.* 1999;93:1287-1298.

137. Treon SP, Maimonis P, Bua D, et al. Elevated soluble MUC1 levels and decreased anti-MUC1 antibody levels in patients with multiple myeloma. *Blood.* 2000;96:3147-3153.

138. Patton S, Gendler SJ, Spicer AP. The epithelial mucin, MUC1, of milk, mammary gland and other tissues. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1241:407-423.

139. Goto T, Kennel SJ, Abe M, et al. A novel membrane antigen selectively expressed on terminally differentiated human B cells. *Blood.* 1994;84:1922-1930.

140. Treon SP, Raje N, Anderson KC. Immunotherapeutic strategies for the treatment of plasma cell malignancies. *Semin Oncol.* 2000;27:598-613.

141. Couturier O, Faivre-Chauvet A, Filippovich IV, et al. Validation of <sup>213</sup>Bi-alpha radioimmunotherapy for multiple myeloma. *Clinical Cancer Research.* 1999;5:3165s-3170s.

142. Giralt S, Bensinger W, Goodman M, et al. <sup>166</sup>Ho-DOTMP plus melphalan followed by peripheral blood stem cell transplantation in patients with multiple myeloma: results of two phase 1/2 trials. *Blood.* 2003;102:2684-2691.

143. Bayouth JE, Macey DJ, Kasi LP, et al. Pharmacokinetics, dosimetry and toxicity of holmium-166-DOTMP for bone marrow ablation in multiple myeloma. *J Nucl Med.* 1995;36:730-737.

144. Breitz H, Wendt R, Stabin M, Bouchet L, Wessels B. Dosimetry of high dose skeletal targeted radiotherapy (STR) with <sup>166</sup>Ho-DOTMP. *Cancer Biother Radiopharm.* 2003;18:225-230.



145. Salacinski PR, McLean C, Sykes JE, Clement JV, Lowry PJ. Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3 alpha,6 alpha-diphenyl glycoluril (Iodogen). *Anal Biochem.* 1981;117:136-146.
146. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation.* 1984;22:27-55.
147. Fertil B, Dertinger H, Courdi A, Malaise EP. Mean inactivation dose: a useful concept for intercomparison of human cell survival curves. *Radiat Res.* 1984;99:73-84.
148. Vandebulcke K, De Vos F, Offner F, et al. In vitro evaluation of (213)Bi-rituximab versus external gamma irradiation for the treatment of B-CLL patients: relative biological efficacy with respect to apoptosis induction and chromosomal damage. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2003;3:3.
149. Byfield JE, Lee YC, Tu L. Molecular interactions between adriamycin and x-ray damage in mammalian tumor cells. *Int J Cancer.* 1977;19:186-193.
150. Bonner JA, Lawrence TS. Doxorubicin decreases the repair of radiation-induced DNA damage. *International Journal of Radiation Biology.* 1990;57:55-64.
151. Lawrence TS, Davis MA, Hough A, Rehemtulla A. The role of apoptosis in 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine (gemcitabine)- mediated radiosensitization. *Clin Cancer Res.* 2001;7:314-319.
152. Jungerman JA, Yu KH, Zanelli CI. Radiation absorbed dose estimates at the cellular level for some electron-emitting radionuclides for radioimmunotherapy. *Int J Appl Radiat Isot.* 1984;35:883-888.
153. Wheldon TE, O'Donoghue JA, Barrett A, Michalowski AS. The curability of tumours of differing size by targeted radiotherapy using 131I or 90Y. *Radiother Oncol.* 1991;21:91-99.
154. Humm JL. Dosimetric aspects of radiolabeled antibodies for tumor therapy. *J Nucl Med.* 1986;27:1490-1497.
155. Abbas Rizvi SM, Henniker AJ, Goozee G, Allen BJ. In vitro testing of the leukaemia monoclonal antibody WM-53 labeled with alpha and beta emitting radioisotopes. *Leuk Res.* 2002;26:37-43.
156. Howell RW, Azure MT, Narra VR, Rao DV. Relative biological effectiveness of alpha-particle emitters in vivo at low doses. *Radiat Res.* 1994;137:352-360.

157. Howell RW, Goddu SM, Narra VR, Fisher DR, Schenter RE, Rao DV. Radiotoxicity of gadolinium-148 and radium-223 in mouse testes: relative biological effectiveness of alpha-particle emitters in vivo. *Radiat Res.* 1997;147:342-348.
158. Prise KM, Ahnstrom G, Belli M, et al. A review of dsb induction data for varying quality radiations. *Int J Radiat Biol.* 1998;74:173-184.
159. Radford IR, Murphy TK, Radley JM, Ellis SL. Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part II. Apoptotic death is shown by all lines examined. *Int J Radiat Biol.* 1994;65:217-227.
160. Meijer AE, Kronqvist US, Lewensohn R, Harms-Ringdahl M. RBE for the induction of apoptosis in human peripheral lymphocytes exposed in vitro to high-LET radiation generated by accelerated nitrogen ions. *Int J Radiat Biol.* 1998;73:169-177.
161. Seidl C, Schrock H, Seidenschwang S, et al. Cell death triggered by alpha-emitting <sup>213</sup>Bi-immunoconjugates in HSC45-M2 gastric cancer cells is different from apoptotic cell death. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2005;32:274-285.
162. Macklis RM, Lin JY, Beresford B, Atcher RW, Hines JJ, Humm JL. Cellular kinetics, dosimetry, and radiobiology of alpha-particle radioimmunotherapy: induction of apoptosis. *Radiation Research.* 1992;130:220-226.
163. Li Y, Rizvi SM, Ranson M, Allen BJ. <sup>213</sup>Bi-PAI2 conjugate selectively induces apoptosis in PC3 metastatic prostate cancer cell line and shows anti-cancer activity in a xenograft animal model. *Br J Cancer.* 2002;86:1197-1203.
164. Milas L, Milas MM, Mason KA. Combination of taxanes with radiation: preclinical studies. *Semin Radiat Oncol.* 1999;9:12-26.
165. DeNardo SJ, Kukis DL, Kroger LA, et al. Synergy of Taxol and radioimmunotherapy with yttrium-90-labeled chimeric L6 antibody: efficacy and toxicity in breast cancer xenografts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:4000-4004.
166. Stein R, Juweid M, Zhang CH, Goldenberg DM. Assessment of combined radioimmunotherapy and chemotherapy for treatment of medullary thyroid cancer. *Clin Cancer Res.* 1999;5:3199s-3206s.
167. Clarke K, Lee FT, Brechbiel MW, Smyth FE, Old LJ, Scott AM. Therapeutic efficacy of anti-Lewis(y) humanized 3S193 radioimmunotherapy in a breast cancer model: enhanced activity when combined with taxol chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2000;6:3621-3628.

168. Johnson TA, Press OW. Synergistic cytotoxicity of iodine-131-anti-CD20 monoclonal antibodies and chemotherapy for treatment of B-cell lymphomas. *Int J Cancer*. 2000;85:104-112.
169. Behr TM, Wulst E, Radetzky S, et al. Improved treatment of medullary thyroid cancer in a nude mouse model by combined radioimmunotherapy: doxorubicin potentiates the therapeutic efficacy of radiolabeled antibodies in a radioresistant tumor type. *Cancer Res*. 1997;57:5309-5319.
170. Dimopoulos MA, Arbuck S, Huber M, et al. Primary therapy of multiple myeloma with paclitaxel (taxol). *Ann Oncol*. 1994;5:757-759.
171. Bilgrami S, Bona RD, Edwards RL, et al. Dexamethasone, paclitaxel, etoposide, cyclophosphamide (d-TEC) and G-CSF for stem cell mobilisation in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant*. 2001;28:137-143.
172. Miller HJ, Leong T, Khandekar JD, Greipp PR, Gertz MA, Kyle RA. Paclitaxel as the initial treatment of multiple myeloma: an Eastern Cooperative Oncology Group Study (E1A93). *Am J Clin Oncol*. 1998;21:553-556.
173. Huizing MT, Keung AC, Rosing H, et al. Pharmacokinetics of paclitaxel and metabolites in a randomized comparative study in platinum-pretreated ovarian cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*. 1993;11:2127-2135.
174. Tishler RB, Schiff PB, Geard CR, Hall EJ. Taxol: a novel radiation sensitizer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1992;22:613-617.
175. Leonard CE, Chan DC, Chou TC, Kumar R, Bunn PA. Paclitaxel enhances in vitro radiosensitivity of squamous carcinoma cell lines of the head and neck. *Cancer Research*. 1996;56:5198-5204.
176. Jordan MA, Wilson L. Microtubule as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4:253-260.
177. Porter LA, Lee JM. alpha-, beta-, and gamma-Tubulin polymerization in response to DNA damage. *Exp Cell Res*. 2001;270:151-158.
178. Lawrence TS, Blackstock AW, McGinn C. The mechanism of action of radiosensitization of conventional chemotherapeutic agents. *Semin Radiat Oncol*. 2003;13:13-21.
179. Milross CG, Mason KA, Hunter NR, Chung WK, Peters LJ, Milas L. Relationship of mitotic arrest and apoptosis to antitumor effect of paclitaxel. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88:1308-1314.

180. Haldar S, Chintapalli J, Croce CM. Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 1996;56:1253-1255.
181. Haldar S, Jena N, Croce CM. Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:4507-4511.
182. Kroning R, Lichtenstein A. Taxol can induce phosphorylation of BCL-2 in multiple myeloma cells and potentiate dexamethasone-induced apoptosis. *Leuk Res.* 1998;22:275-286.
183. Gazitt Y, Rothenberg ML, Hilsenbeck SG, Fey V, Thomas C, Montegomrey W. Bcl-2 overexpression is associated with resistance to paclitaxel, but not gemcitabine, in multiple myeloma cells. *Int J Oncol.* 1998;13:839-848.
184. Panaretakis T, Pokrovskaja K, Shoshan MC, Grander D. Activation of Bak, Bax, and BH3-only proteins in the apoptotic response to doxorubicin. *J Biol Chem.* 2002;277:44317-44326.
185. Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics.* 2004;59:928-942.
186. Blakely EA, Ngo FQH, Curtis SB, Tobias CA. Heavy-ion radiobiology: Cellular studies. *Adv Radiat Biol.* 1984;11:pp. 295–389.
187. Latz D, Fleckenstein K, Eble M, Blatter J, Wannemacher M, Weber KJ. Radiosensitizing potential of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'- deoxycytidine) within the cell cycle in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1998;41:875-882.
188. Ostruszka LJ, Shewach DS. The role of cell cycle progression in radiosensitization by 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine. *Cancer Research.* 2000;60:6080-6088.
189. Tolis C, Peters GJ, Ferreira CG, Pinedo HM, Giaccone G. Cell cycle disturbances and apoptosis induced by topotecan and gemcitabine on human lung cancer cell lines. *Eur J Cancer.* 1999;35:796-807.
190. Bouffard DY, Momparler RL. Comparison of the induction of apoptosis in human leukemic cell lines by 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) and cytosine arabinoside. *Leuk Res.* 1995;19:849-856.
191. Huang P, Robertson LE, Wright S, Plunkett W. High molecular weight DNA fragmentation: a critical event in nucleoside analogue-induced apoptosis in leukemia cells. *Clin Cancer Res.* 1995;1:1005-1013.
192. Modrak DE, Cardillo TM, Newsome GA, Goldenberg DM, Gold DV. Synergistic interaction between sphingomyelin and gemcitabine potentiates ceramide-mediated apoptosis in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2004;64:8405-8410.

193. Lobrich M, Cooper PK, Rydberg B. Non-random distribution of DNA double-strand breaks induced by particle irradiation. *Int J Radiat Biol.* 1996;70:493-503.
194. Hoglund E, Blomquist E, Carlsson J, Stenerlow B. DNA damage induced by radiation of different linear energy transfer: initial fragmentation. *Int J Radiat Biol.* 2000;76:539-547.
195. Heilmann J, Taucher-Scholz G, Haberer T, Scholz M, Kraft G. Measurement of intracellular dna double-strand break induction and rejoining along the track of carbon and neon particle beams in water. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1996;34:599-608.
196. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:155-168.
197. van Putten JWG, Groen HJM, Smid K, Peters GJ, Kampinga HH. End-joining deficiency and radiosensitization induced by gemcitabine. *Cancer Res.* 2001;61:1585-1591.
198. Wachters FM, van Putten JW, Maring JG, Zdzienicka MZ, Groen HJ, Kampinga HH. Selective targeting of homologous DNA recombination repair by gemcitabine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003;57:553-562.
199. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:489-501.
200. Kharbanda S, Yuan ZM, Weichselbaum R, Kufe D. Determination of cell fate by c-Abl activation in the response to DNA damage. *Oncogene.* 1998;17:3309-3318.
201. Dingli D, Diaz RM, Bergert ER, O'Connor MK, Morris JC, Russell SJ. Genetically targeted radiotherapy for multiple myeloma. *Blood.* 2003;2002-2011-3390.
202. Asosingh K, De Raeve H, Van Riet I, Van Camp B, Vanderkerken K. Multiple myeloma tumor progression in the 5T2MM murine model is a multistage and dynamic process of differentiation, proliferation, invasion, and apoptosis. *Blood.* 2003;101:3136-3141.
203. Manning LS, Berger JD, O'Donoghue HL, Sheridan GN, Claringbold PG, Turner JH. A model of multiple myeloma: culture of 5T33 murine myeloma cells and evaluation of tumorigenicity in the C57BL/KaLwRij mouse. *Br J Cancer.* 1992;66:1088-1093.
204. Orchard K, Cooper M, Wijdenes J, et al. VII International Myeloma Workshop. Banff Springs Hotel. Banff, Alberta, Canada; 2001:178.

## RADIOIMMUNOTHÉRAPIE ALPHA DU MYÉLOME MULTIPLE

La radioimmunothérapie alpha permet de vectoriser un radioélément émetteur de particules alpha au contact de cellules tumorales. Nous avons appliqué cette thérapeutique pour le traitement du myélome multiple, dans le but de déterminer les modalités les plus adaptées à un passage vers des études cliniques ultérieures. La première étape a permis de déterminer l'anticorps et le radioélément le mieux adapté pour la radioimmunothérapie et de mieux comprendre les mécanismes de la mort cellulaire radioinduite par l'irradiation alpha. Nous avons mis en évidence des différences de sensibilité des lignées de myélome multiple, ce qui nous a amené dans une deuxième étape à rechercher une majoration de l'efficacité de la radioimmunothérapie alpha par la combinaison de chimiothérapies anti-mitotiques. Nous avons observé un effet supra-additif entre la RIT alpha et le paclitaxel ou la doxorubicine. Enfin, dans une troisième étape, nous avons analysé l'implication de la voie de K-ras afin de comprendre les mécanismes de transduction du signal impliqués dans la réponse à la radioimmunothérapie alpha.

Radioimmunothérapie  
Myélome multiple  
Particules alpha  
K-ras  
Paclitaxel  
Doxorubicine

## ALPHA-RADIOIMMUNOTHERAPY OF MULTIPLE MYELOMA

Alpha-radioimmunotherapy can vectorize an alpha particle emitter to target cancer cells. We developed this technique for the treatment of multiple myeloma, with the goal of determining the best suited modalities for later clinical studies. A first step determined the antibody and the radionuclide best suited for radioimmunotherapy and to better understand the mechanisms of alpha-radioimmunotherapy induced cell death. We observed some difference in the radiosensitivity of cell lines and decided in a second step to increase the efficacy of alpha-radioimmunotherapy by combining chemotherapeutic drugs. We found a synergistic effect between alpha-RIT and paclitaxel or doxorubicin. In a third and last step, we analysed the K-ras pathway in order to understand signal transduction following alpha-radioimmunotherapy.

Radioimmunothérapie  
Multiple myeloma  
Alpha particles  
K-ras  
Paclitaxel  
Doxorubicin

SUPIOT Stéphane  
46-1 rue François Bruneau  
44000 NANTES