

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

Ecole Doctorale BIOLOGIE SANTE

Année 2012

N° attribué par la bibliothèque

Cancer du Sein Triple Négatif : Ciblage du Syndecan-1 pour la Radioimmunothérapie et l'ImmunoTEP

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie, Médecine et Santé
Spécialité : Médecine Nucléaire

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Caroline RICHARD ép ROUSSEAU

Le 10 Octobre 2012, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs : Pr P. Bourguet
Pr J-P Vuillez

Examineurs : Dr J. Barbet
Pr P-Y. Salaün

Invité : Pr M. ChereL

Directeurs de thèse : Pr F. Kraeber-Bodéré, Dr F. Davodeau

**SOMMAIRE, LISTES DES FIGURES, DES TABLEAUX ET
DES ABREVIATIONS**

SOMMAIRE

CHAPITRE I. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES11

I. INTRODUCTION

II. CANCER DU SEIN TRIPLE NEGATIF

II.1. Concept de cancer du sein triple négatif (TN)14

II.1.1. Rationnel et définitions

II.1.2. Epidémiologie et profil évolutif

II.1.3. Anatomopathologie des cancers du sein TN

II.2. Basal-like breast cancer (BLBC)19

II.2.1. Profil moléculaire et immunohistochimique

II.2.2. Epidémiologie

II.2.3. Anatomopathologie

II.2.4. BLBC et BRCA1

II.2.5. Problématique du cancer du sein TN versus BLBC

II.3. Traitements22

II.3.1. Les agents de chimiothérapie

II.3.2. Les thérapies ciblées

II.3.2.1. La famille EGFR

II.3.2.2. Les inhibiteurs de l'angiogenèse

II.3.2.3. Les inhibiteurs PARP et les mécanismes de réparation de l'ADN

II.3.3. Perspectives et conclusion

III. RADIOIMMUNOTHÉRAPIE (RIT)

III.1. Historique24

III.2. Principe26

III.3. Paramètres déterminant l'efficacité28

III.3.1. Anticorps (AcM)

III.3.2. Antigène (Ag)

III.3.3. Radioélément

III.3.4. Caractéristiques de la tumeur

III.3.4.1. Radiosensibilité tumorale	
III.3.4.2. Accès à la tumeur	
III.3.4.3. Masse tumorale	
III.4. Optimisation de la RIT	43
III.4.1. Augmentation de la fixation tumorale	
III.4.1.1. Augmentation du flux sanguin et réduction des pressions intra-tumorales	
III.4.1.2. Augmentation de l'expression antigénique	
III.4.2. Diminution de l'irradiation non spécifique	
III.4.2.1. Réduction de l'anticorps en excès	
III.4.2.2. Administration d'AcM froids	
III.4.2.3. Pré-ciblage et anticorps bispécifique	
III.4.3. Diminution de l'immunogénéicité des AcM	
III.4.4. Voie d'administration	
III.5. RIT et tumeurs solides.....	48

IV. IMMUNOTEP

IV.1. Concept de « médecine personnalisée »	52
IV.2. Rôle émergent de l'immunoTEP	53
IV.3. Applications de l'immunoTEP	55

V. IMMUNOCIBLAGE DU CANCER DU SEIN

V.1. RIT du cancer du sein	57
V.1.2. Ciblage de l'Antigène Carcino-Embryonnaire (ACE)	
V.1.3. Ciblage de l'antigène MUC-1	
V.1.4. Ciblage de l'antigène L6	
V.1.5. Ciblage de l'antigène TAG-72	
V.1.6. Ciblage de l'antigène Le ^y (Lewis)	
V.2. Imagerie phénotypique et immunoTEP du cancer du sein	68
V.3. Nouvelle cible : le syndecan-1.....	70
V.3.1. Généralités	
V.3.1.1. La famille des syndecans	
V.3.1.2. Structure des syndecans et en particulier le syndecan-1	
V.3.1.3. Implications du syndecan-1 dans le processus cancéreux	
V.3.2. Le Syndecan-1 dans le Myélome Multiple (MM)	
V.3.2.1. Expression et fonction du syndecan-1 dans le MM	
V.3.2.2. Syndecan-1 comme cible thérapeutique pour le MM	
V.3.3. L'implication du syndecan-1 dans le cancer du sein	

CHAPITRE II. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE92

CHAPITRE III. ETUDES PRECLINIQUES94

I. Radioimmunothérapie ciblant le syndecan-1 avec l'anticorps B-B4 marqué à l'iode 131 dans un modèle de xénogreffe de cancer du sein triple négatif

I.1. Résumé95

I.2. Matériel et Méthodes96

I.2.1. Lignée cellulaire

I.2.2. Modèle animal

I.2.3. Immunoréactivité et affinité du 125I-B-B4

I.2.4. Immunohistochimie tumorale

I.2.5. Etude de biodistribution du 125I-B-B4

I.2.6. Etude d'escalade d'activité et de RIT avec 125I-B-B4

I.3. Résultats98

I.3.1. Immunoréactivité et affinité

I.3.2. Immunohistochimie

I.3.3. Biodistribution du 125I-B-B4

I.3.4. Toxicité et détermination de la DMT

I.3.5. Efficacité de la RIT

I.4. Discussion110

I.5. Article : Syndecan-1 antigen, a promising new target for triple-negative breast cancer immuno-PET and radioimmunotherapy. A preclinical study on MDA-MB-468 xenograft tumors.

II. De la radioimmunothérapie à l'immunoTEP avec l'anti-CD138 (B-B4) marqué à l'iode 124 dans un modèle de xénogreffe de cancer du sein triple négatif

II.1. Résumé	114
II. 2. Introduction	115
II.3. Matériel et Méthodes	116
II.3.1. Lignée cellulaire et modèle animal	
II.3.2. Immunohistochimie tumorale	
II.3.3. Marquage de l'anticorps B-B4 à l'iode 124 et contrôles	
II.3.4. Imagerie TEP	
II.3.5. Etude de biodistribution du ¹²⁴ I-B-B4	
II.3.6. Etudes pharmacocinétiques	
II. 4. Résultats	119
II.4.1. Immunohistochimie des tumeurs MDA-MB 468	
II.4.2. Biodistribution du ¹²⁴ I-B-B4	
II.4.3. TEP au FDG et à la FLT	
II.4.4. ImmunoTEP au ¹²⁴ I-B-B4	
II.4.5. Modélisation pharmacocinétique	
II. 5. Discussion	128

CHAPITRE IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES134

CHAPITRE V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES136

ANNEXES162

Article: Dosimetry results suggest feasibility of radioimmunotherapy using anti-CD138 (B-B4) antibody in multiple myeloma patients

Liste des figures

- Figure 1** : Premiers sites métastatiques pour les cancers du sein TN et les non-TN
- Figure 2** : Survie à 5 ans en fonction du stade au diagnostic, cancer du sein TN versus non-TN
- Figure 3** : Taux de rechute métastatique précoce élevé
- Figure 4** ; Histologie et immunohistochimie des cancers du sein TN
- Figure 5** : Comparaison entre les cancers du sein TN et BLBC
- Figure 6** : Anticorps chimériques et humanisés
- Figure 7** : Les différents modes d'action des anticorps
- Figure 8** : Facteurs déterminants l'efficacité de la RIT
- Figure 9** : Les différents formats d'anticorps
- Figure 10** : Vascularisation tumorale
- Figure 11** : Physiopathologie tumorale
- Figure 12** : Facteurs à prendre en compte pour élaborer un traceur d'immunoTEP
- Figure 13** : Aspect de la glycoprotéine MUC-1 pour une cellule normale et une cellule maligne
- Figure 14** : Face antérieure réalisée avec 5 mCi ^{111}In —DOTA-peptide-m170. Mise en évidence d'une métastase d'un cancer du sein en supraclaviculaire droit et en médiastinal
- Figure 15** : Localisation et classification des PGs membranaires et intracellulaires
- Figure 16**: Schéma des 4 syndecans
- Figure 17** : Clivage d'un syndecan par une protéinase
- Figure 18** : rôle biologique des syndecans dans les cancers
- Figure 19** : Modèle montrant l'expression et la fonction du syndecan-1 dans le microenvironnement du myélome
- Figure 20** : une forte expression du syndecan-1 est associée à un mauvais pronostic
- Figure 21** : Immunomarquage du syndecan-1
- Figure 22** : Courbes de survie sans rechute de Kaplan-Meier selon l'expression du syndecan-1 épithéliale et/ou stromale

Figure 23 : dans le cancer du sein, l'expression stromale du syndecan-1 est corrélée avec une architecture de la MEC en fibres parallèles

Figure 24 : Etude de la liaison à l'équilibre du ^{125}I -B-B4 sur la lignée MDA-MB-468

Figure 25 : Immunoréactivité du ^{125}I -B-B4

Figure 26 : Etude immunohistochimique du B-B4 sur coupes de tumeurs MDA-MB-468

Figure 27 : Etude de la biodistribution du ^{125}I -B-B4, sur des souris *nude* greffées avec 5.10^6 de cellules de la lignée MDA-MB-468 de cancer du sein humain

Figure 28 : Comparaison de la biodistribution du B-B4 spécifique avec l'anticorps 7D4 non spécifique du syndecan-1

Figure 29 : Toxicité hématologique du ^{131}I -B-B4

Figure 30 : Evaluation de la réponse tumorale en RIT ^{131}I -B-B4

Figure 31 : Etude comparative des volumes tumoraux moyens des différents groupes traités (14,8 et 22,2 MBq ^{131}I -B-B4) et du groupe témoin

Figure 32 : Etude du temps de doublement des tumeurs traitées en RIT ^{131}I -B-B4 aux activités de 14,8 et 22, 2 MBq comparé à un groupe non traité

Figure 33: Lignée cellulaire humaine (MDA-MB 468) de cancer du sein triple négatif

Figure 34 : Etude de la biodistribution du ^{124}I -B-B4, sur des souris *nude* greffées avec 5.10^6 de cellules de la lignée MDA-MB-468 de cancer du sein humain

Figure 35 : Rapports Tumeur/organes sains calculés à partir des données de biodistribution du ^{124}I -B-B4 pour chaque temps de sacrifice

Figure 36 : Comparaison des images TEP de souris avec des tumeurs MDA-MB 468 sous cutanées 1h après l'injection de 6,2 MBq de FDG et 6 MBq de FLT avec celles d'immunoTEP à 96h après injection de 3,3 MBq de ^{124}I -B-B4

Figure 37 : Images d'immunoTEP au ^{124}I -B-B4

Figure 38 : Modélisation des cinétiques dans les tissus d'intérêt

Liste des tableaux

Tableau 1 : Association entre TN et BRCA1

Tableau 2 : Propriétés de ciblage des formes différentes d'anticorps

Tableau 3 : Propriétés physiques des radioéléments présentant un intérêt pour la RIT

Tableau 4 : Radioéléments utilisables en TEP avec des AcM et des fragments

Tableau 5 : Syndecan-1 et cancer du sein

Tableau 6 : Rapports Tumeur/Tissus sains calculés à partir des données de biodistribution du ^{124}I -B-B4 pour chaque temps de sacrifice

Tableau 7 : Moyennes des rapports tumeur/muscle (T/M) calculées sur les images TEP FDG et FLT 1h après l'injection de chaque traceur

Tableau 8 : Moyennes des rapports tumeur/foie (T/F en noir), tumeur/cœur (T/C en rouge) et tumeur/muscle (T/M en bleu) calculées sur les images TEP au cours du temps

Liste des abréviations

ACE: Antigène Carcino-Embryonnaire
AcBs : Anticorps bispécifique
AcM : Anticorps Monoclonal
ADN: Acide Désoxyribonucléïque
AFP : Alphafoetoprotéine
Ag: Antigène
bFGF : basic Fibroblast Growth Factor
BLCC: Basal-like Breast Cancer
BRCA 1: Breast Cancer 1
Cancer du sein TN : cancer du sein Triple Négatif
CD 138 : syndecan-1
CK 5/6: Cytokératine 5/6
CP: Cancer de prostate
DL₅₀ : Dose Létale médiane
EGF: Epidermal Growth Factor
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
ER: Estrogen Receptor
E+: Expression épithéliale du syndecan-1
FDG: fluorodésoxyglucose
FES : Fluoro-oestradiol
FGF-2: Fibroblast Growth Factor-2
FIT: Firstline Indolent Trial
FLT: 3'-Fluoro-3' deoxythymidine
GAG : Glycosaminoglycane
GSH : Glutathione (Glutamate Side-Chain)
HAHA : Human Anti-Human Antibody
HAMA : Human Anti-Murine Antibody
Her 1: Human Growth Factor Receptor 1

Her 2: Human Growth Factor Receptor 2
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HS : Héparane-Sulfate
IFN- γ : Interféron- γ
Ig: Immunoglobuline
IGF-1 : Insulin-like Growth Factor-1
IL2 : Interleukine 2
iTEP : ImmunoTEP
I.V.: Intra-veineuse
Ki67 : Antigène KI67
MEC : Matrice extra-cellulaire
MM : Myélome Multiple
MMP: Matrix Metalloproteinase
MUC-1 : Mucin-1
PARP: Poly(ADP-Ribose)Polymérase
PDGF: Platelet Derived Growth Factor
PG : Protéoglycane
PR: Progesterone Receptor
PSMA: Prostate Specific Membrane Antigen
RIT : Radioimmunothérapie
RIV : Radiothérapie interne vectorisée
RH: Récepteurs Hormonaux
S/B : Signal/Bruit
scFv: Single-chain Fv Fragment
Sdc-1: Syndecan-1
SDF-1: Stromal Cell-Derived Factor-1
SUV: Standard Uptake Value
S+: Expression stromale du syndecan-1
TEP : Tomographie d'Emission de Positons
T/C: Tumeur/Coeur
T/F: Tumeur/Foie

T/M: Tumeur/Muscle

TKI: Tyrosine Kinase Inhibitor

TNF- α : Tumor Necrosis factor- α

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VPN: Valeur Prédicative Négative

VPP: Valeur Prédicative Positive

CHAPITRE I. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. INTRODUCTION

Le cancer du sein est dans l'ensemble des pays industrialisés un réel problème de santé publique, représentant la première cause de cancer (35,7%) chez la femme (Bray et coll., 2004) et la première cause de mortalité par cancer (20,2%) (Botha et coll., 2003). L'incidence est variable selon l'âge avec un pic de fréquence chez les 50-74 ans.

Différentes approches thérapeutiques peuvent être utilisées dans la prise en charge de ces cancers, les indications variant selon le type histologique, l'extension de la maladie, l'état général de la patiente et ses antécédents médicaux. On peut distinguer globalement les traitements loco-régionaux et les traitements généraux ou systémiques. Dans la plupart des cas et d'autant plus que la tumeur est disséminée, les différentes armes thérapeutiques sont associées, en alternance ou en concomitance. Ces stratégies appliquent le concept de coopération spatiale : les traitements loco-régionaux (chirurgie, radiothérapie externe) permettant de stériliser la tumeur primitive, les traitements généraux, souvent la chimiothérapie, d'éradiquer les métastases à distance. Une potentialisation des effets anti-tumoraux est également recherchée par l'association de thérapies systémiques.

Le cancer du sein est considéré comme une tumeur radio-chimiosensible ; néanmoins, l'avènement de nouvelles approches thérapeutiques ces dernières années n'a pas permis de modifier de manière significative la médiane de survie des patientes métastatiques (Ruiterkamp et coll., 2011). Plusieurs cibles antigéniques ont été identifiées et les thérapies ciblées utilisant des anticorps monoclonaux (AcM) apparaissent intéressantes, notamment au stade de maladie résiduelle. La radioimmunothérapie (RIT) est une forme de radiothérapie vectorisée ou moléculaire utilisant des AcM, spécifiques de la tumeur, couplés à des atomes radioactifs. Bien qu'une seule molécule soit actuellement disponible en routine clinique en Europe, le Zevalin pour le traitement des lymphomes B, l'approche de RIT a clairement montré son

efficacité en hématologie et semble aussi très prometteuse pour les tumeurs solides plus radio-résistantes, notamment en injections fractionnées, avec des techniques de préciblage ou en consolidation pour cibler la maladie au stade de maladie résiduelle (Goldenberg et coll., 2010, Bodet-Milin et coll., 2008). Le cancer du sein métastatique, dans sa forme triple négative, de mauvais pronostic, apparaît une indication intéressante pour la RIT, en raison de l'efficacité limitée des traitements disponibles, l'expression d'antigènes (Ag) bien caractérisée et la relative radio-sensibilité de cette maladie.

II. LE CANCER DU SEIN TRIPLE NEGATIF

II.1. Concept de triple négatif (TN)

Le sous-type « triple négatif » (TN) dans le cancer du sein a été rapporté dans la littérature pour la première fois en octobre 2006. Depuis, plus de 600 publications débattent du sujet (Brenton et coll., 2005), montrant l'importance grandissante de cette entité (Staudacher. 2009).

II.1.1. Rationnel et définitions

Les cancers mammaires sont classés selon leur type histologique, leur grade, leur statut hormonal (RH) et leur statut Her2 ce qui conduit à considérer 4 sous-groupes : RH+/Her2-, RH+/Her2+, RH-/Her2+ et RH-/Her2.

L'intérêt de la stratification RH a été démontré depuis de nombreuses années du fait de son implication thérapeutique. En effet, l'hormonothérapie est le traitement clé chez la quasi-totalité des patientes dites RH+ (Goss et coll., 2001, Alastair et coll., 2003). De même depuis environ 1999, il est systématiquement déterminé le statut Her2 en raison de la cible thérapeutique que représente le récepteur de type 2 à l'*Epidermal Growth Factor* (EGFR-2) quand il est surexprimé (Radvin et coll., 1995). En effet, lors du développement de molécules spécifiques, le Trastuzumab a été le premier à bouleverser le pronostic de ces patientes dites Her2+ (Piccart-Geghart et coll., 2005). Les nouveaux agents anti-Her2 de type TKI (*Tyrosine Kinase Inhibitor*) se révèlent, de plus, prometteurs (Di Leo et coll., 2008).

En revanche, il n'existe pas actuellement de thérapeutique ciblée disponible pour le groupe 4 (RH-/Her2-) ou carcinome mammaire TN. Malgré les nouveaux schémas de chimiothérapie, le pronostic reste sombre (Reis-Filho, Tutt et coll., 2008, Rakha et coll., 2007A).

Récemment, des techniques de biologie moléculaire de type *microarray*, ont permis de classer les cancers du sein en 5 groupes distincts (Perou et coll., 2000, Lim et coll., 2009, Sorlie et coll., 2003) :

- Luminal A breast cancer
- Luminal B breast cancer
- Normal breast-like cancer
- Her2+ breast cancer
- Basal-like breast cancer (BLBC)

Soixante-quinze à 85% des cancers du sein TN appartiennent à la classe BLBC (Rakha et coll., 2007B).

II.1.2. Epidémiologie et profil évolutif

L'incidence des cancers du sein TN varie entre 10 et 17% selon les séries et selon les méthodes pour définir le seuil de positivité et de négativité, de l'expression des RH et de Her2 (Carey et coll., 2007). Au diagnostic, l'âge médian est plus jeune dans cette population et la proportion des stades avancés est plus forte que dans les autres cancers du sein non-TN. Il existe, de plus, des disparités ethno-sociologiques aux USA où les cancers du sein TN sont plus fréquents chez les femmes afro-américaines et hispaniques. Le siège des sites métastatiques est un peu différent de celui observé dans le cancer du sein non-TN.

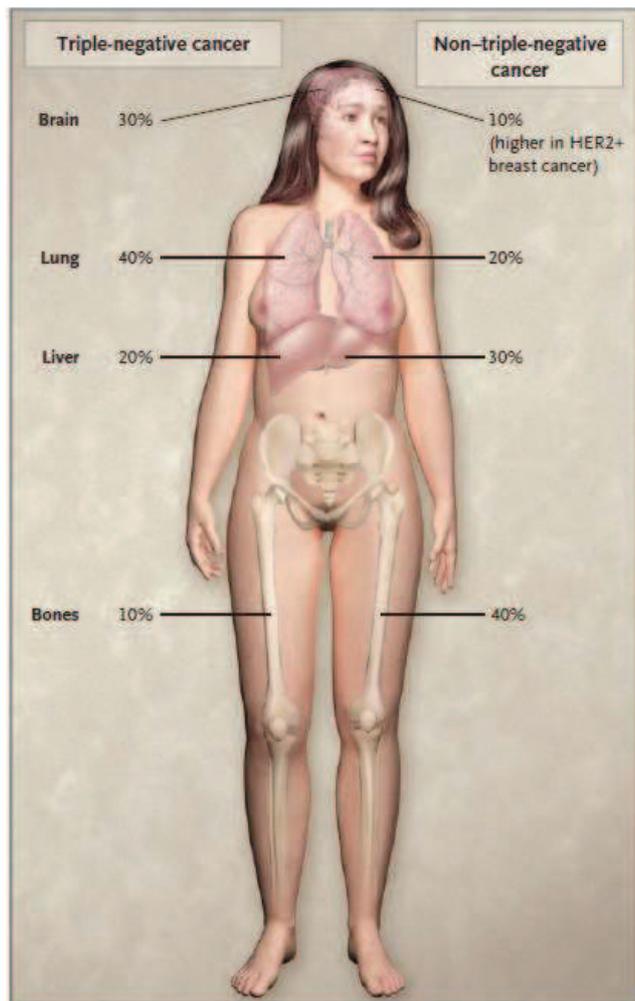


Figure 1 : Premiers sites métastatiques pour les cancers du sein TN et les non-TN
 (d'après Dent et coll., 2009, Rodriguez-Pinilla et coll., 2006, Liedtke et coll., 2008)

Il s'agit de cancers agressifs, de mauvais pronostic avec un risque important de rechute et de décès dans les 5 premières années après le diagnostic initial comme décrit dans les figures 2 et 3.

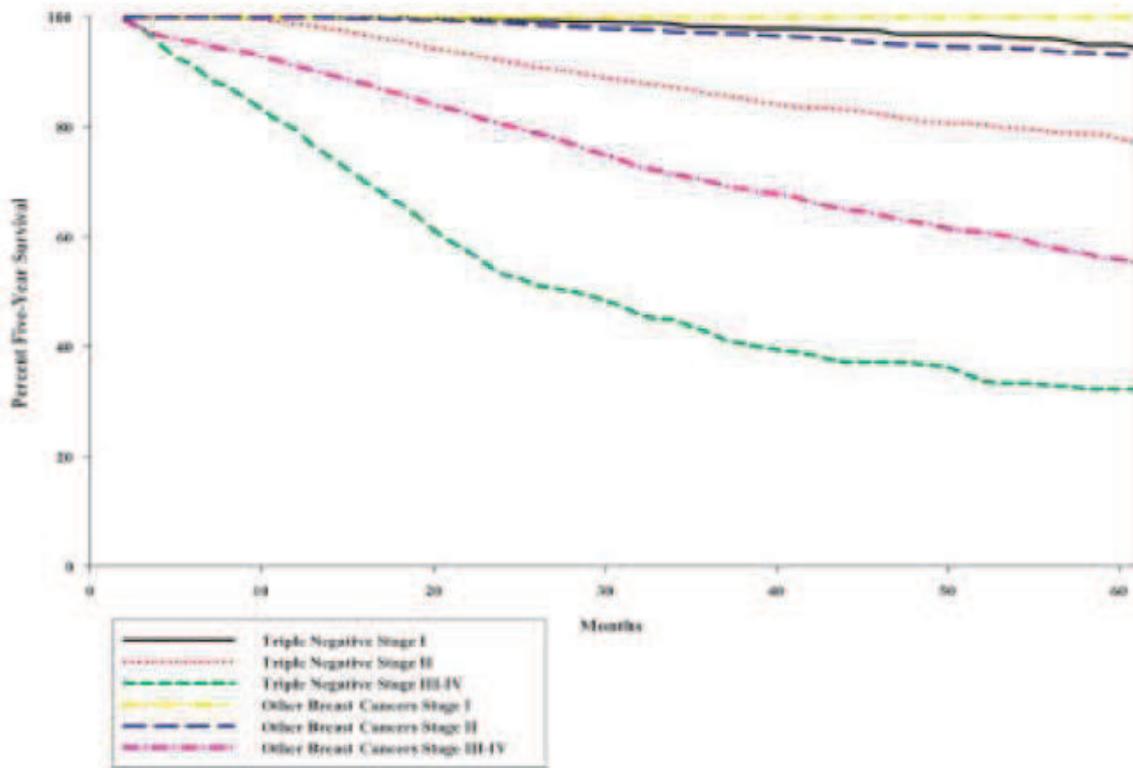


Figure 2 : Survie à 5 ans en fonction du stade au diagnostic, cancer du sein TN versus non-TN (d'après Bauer et coll., 2007)

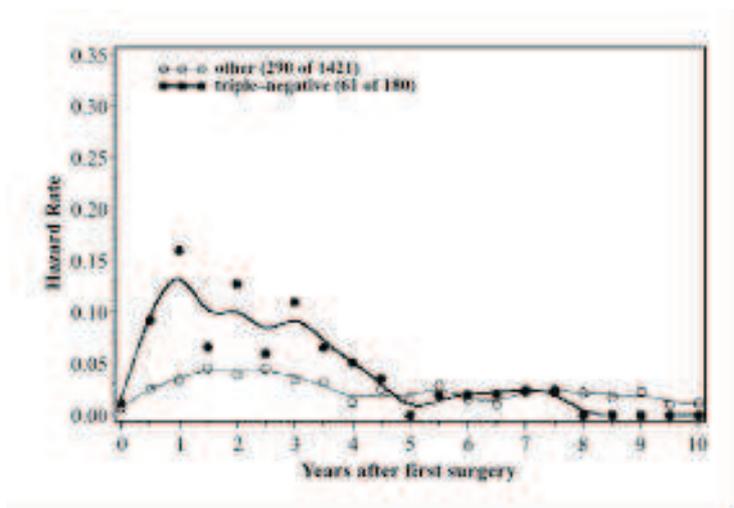


Figure 3 : Taux de rechute métastatique précoce élevé (d'après Dent et coll., 2007)

II.1.3. Anatomopathologie des cancers du sein TN

Sur le plan histologique, on retrouve essentiellement des carcinomes canauxaux de haut grade. Les caractéristiques tumorales morphologiques sont celles d'un cancer agressif: la masse tumorale refoule les tissus voisins et présente des zones de nécrose et souvent centrales comme décrit dans la figure 4 (Diaz et coll., 2007). La taille tumorale moyenne est plus élevée au moment du diagnostic (>2 cm de diamètre dans 2/3 des cas), l'envahissement ganglionnaire plus fréquent : 54% (Dent et coll., 2007). Récemment, grâce à des études génomiques, il a été possible d'intégrer les cancers du sein TN dans le groupe des BLBC, bien que les deux entités ne soient pas strictement superposables comme décrit dans la figure 5.

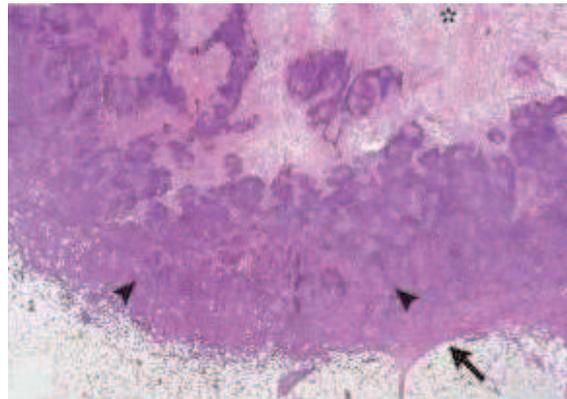


Figure 4. Histologie et immunohistochimie des cancers du sein TN

(d'après Foulkes et coll., 2010)

Les cancers du sein TN semblent envahir le tissu normal (flèches). Nécrose centrale (astérisque) (Coloration HE)

II.2. Basal-like breast cancer (BLBC)

II.2.1. Profil moléculaire et immunohistochimique

Comme décrit précédemment, il existe 5 profils moléculaires identifiés (Reddy et coll., 2011, Rakha et coll., 2008, Sorlie et coll., 2001):

- **Luminal A breast cancer:** ER+ et PR-, profil d'expression moléculaire proche des cellules mammaires épithéliales superficielles
- **Luminal B breast cancer:** ER- ou PR+, profil d'expression moléculaire proche des cellules mammaires épithéliales superficielles
- **Her2 positive breast cancer:** ER- et PR-, surexpression de Her2
- **Normal breast-like cancer :** ER-, expression de gènes de cellules non épithéliales en particulier adipocytaires
- **Basal-like breast cancer (BLBC):** ER-, expression génique proche des cellules basales mammaires.

Cette classification, basée sur des études génomiques, permet une modélisation très innovante de la maladie « cancer du sein ». Elle permet d'intégrer les TN dans le groupe des BLBC, bien que les entités ne soient pas strictement superposables et rend envisageable, ce vers quoi tend l'oncologie médicale actuellement : l'éventualité d'une individualisation des stratégies thérapeutiques.

Plusieurs auteurs ont proposé des méthodes d'identification simplifiées des BLBC. Nielsen et al. ont proposé une signature phénotypique basée sur la recherche de l'expression en immuno histo-chimie de CK5/6, Her1 et/ou de c-Kit et la perte de l'expression de ER, et Her2 (Nielsen et coll., 2004). Cette signature a une spécificité de 100% mais une sensibilité de 76%.

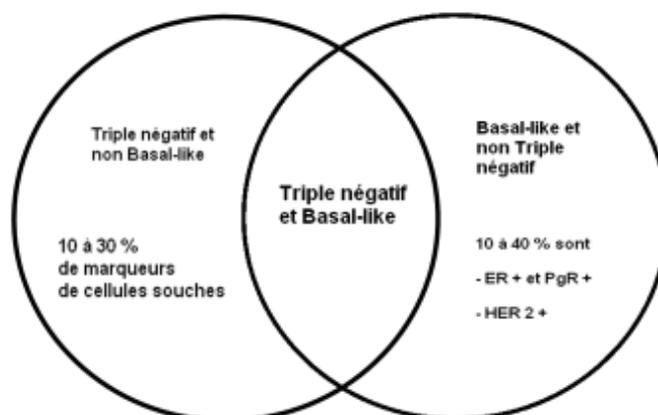


Figure 5. Comparaison entre les cancers du sein TN et BLBC

(d'après Frères et coll., 2010)

Il existe chez les BLBC une fréquence élevée de mutations géniques, surexpression/amplification ou de répression/délétion (Chin et coll., 2006), ces derniers signant un haut degré d'altération des mécanismes de réparation de l'ADN.

II.2.2. Epidémiologie

Les BLBC représentent de 8 à 20% de l'ensemble des cancers mammaires (Perou et coll., 2000) et d'importantes similitudes sont retrouvées avec les données du TN: jeune âge au diagnostic, sur-représentation dans l'ethnie afro-américaine, taille tumorale au diagnostic plus élevée, invasion ganglionnaire plus fréquente et survie globale et sans récurrence plus courtes (Milikian et coll., 2008). Par rapport aux autres sous-types de cancer du sein, l'incidence des métastases cérébrales et pulmonaires est plus fréquente (Dent et coll., 2009, Rodriguez-Pinilla et coll., 2006, Liedtke et coll., 2008).

II.2.3. Anatomopathologie

L'entité BLBC présente un index mitotique très souvent élevé, des zones de nécrose fréquentes, une réponse lymphocytaire stromale de manière quasi-constante, des marges tumorales souvent insuffisantes (sous-estimation fréquente per-opératoire) et

des éléments métaplasiques (Livasy et coll., 2006, Rakha et coll., 2006).

II.2.4. BLBC et BRCA1

Il existe une certaine cohérence à définir un lien entre les cancers du sein TN, BLBC et la voie BRCA1 : tableau 1 (Turner et coll., 2006, Chacon et coll., 2010). La majorité des cancers du sein des patientes présentant une mutation familiale du gène BRCA1 ont un aspect morphologique de type TN ou BLBC. Leur profil immunohistochimique est superposable dans 75 à 90% des cas (Foulkes et coll., 2003), ainsi que leur degré d'instabilité génique liée à une pathologie primitive de la réparation de l'ADN (Mullan et coll., 2006). Leur profil évolutif est également semblable (Foulkes et coll., 2004).

Association	Incidence
Tumeurs avec mutation BRCA1 sont TN	90%
Tumeurs BRCA1 sont BLBC	80-90%
Tumeurs TN sont des tumeurs avec mutation BRCA1	10%

Tableau 1 : Association entre TN et BRCA1 (Chacon et coll., 2010)

II.2.5. Problématique du cancer du sein TN versus BLBC

Il existe un débat sur l'intérêt de la distinction des TN et BLBC. Selon certains (Rakha et coll., 2007B ; Reis-Filho et coll., 2008), les 2 populations sont quasiment superposables et leur distinction sans impact thérapeutique. L'identification des BLBC utilise des méthodes anatomopathologiques complexes, coûteuses et incomplètement validées à ce jour.

D'autres auteurs défendent (Bertucci et coll., 2008) la dénomination précise BLBC, s'appuyant sur une classification génomique, avec une différence de pronostic indiscutable en défaveur du sous-groupe BLBC. Une méthode d'identification des BLBC pourrait selon eux avoir rapidement un intérêt pratique dans les thérapies ciblées en cours d'évaluation (inhibiteurs de PARP, anti-EGFR, anti-cKit).

II.3.Traitements

S'il n'existe pas de consensus concernant la classification phénotypique des cancers du sein TN et BLBC, il n'existe pas non plus de standard thérapeutique.

II.3.1. Les agents de chimiothérapie

La chimiothérapie est le seul traitement systémique actuellement validé dans les cancers du sein TN. Etant donné leur index mitotique élevé, ces tumeurs sont plus chimiosensibles que les autres sous-groupes en particulier en situation néoadjuvante. Le paradoxe est que cela ne se traduit pas par une amélioration de la survie globale (Liedtke et coll., 2008).

La place des anthracyclines dans la prise en charge des patientes TNBC reste controversée au regard des études publiées bien qu'en théorie, il s'agisse d'une drogue idéale compte tenu de sa cible thérapeutique, la Topoisomérase II (Topo II) qui est impliquée dans la réparation de l'instabilité génomique (Dhesy-Thind et coll., 2008).

De même, pour les taxanes, les résultats des études cliniques, ne permettent pas de conclure de manière univoque (Hugh et coll., 2009; Ellis et coll., 2009).

La combinaison anthracyclines-taxanes montre un taux de réponse complète anatomo-pathologique de 38% pour les TN contre 14% pour les cancers du sein nonTN (Wang et coll., 2009).

Par ailleurs, les sels de platine sont proposés en raison de leur capacité à induire des cassures double-brin irréversibles ce qui semble séduisant en regard de l'instabilité génomique de l'entité TN. Il est décrit un taux de réponse clinique complète de 88% pour l'entité TN comparée à des tumeurs mammaires autres qui répondent à 55%. Les données cliniques sont encourageantes mais demandent à être validées par des études de phase III (Sirohi et coll., 2008).

II.3.2. Les thérapies ciblées

II.3.2.1. La famille EGFR

Une surexpression de HER1 est rapportée dans plus de 50% des tumeurs TN et 72%

des tumeurs BLBC. HER1 est impliqué dans les signaux de prolifération et de survie cellulaire. Les résultats des études cliniques évaluant des AcM ou des inhibiteurs de tyrosine kinase bloquant HER1 sont décevants. (De Laurentiis et coll., 2010).

II.3.2.2. Les inhibiteurs de l'angiogenèse

La néo-angiogenèse joue un rôle important dans la croissance tumorale. Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est le premier facteur contrôlant la formation des vaisseaux. Il n'est pas surexprimé de façon spécifique dans les tumeurs TN mais la vascularisation joue un rôle important dans la dissémination métastatique de la maladie (Bando et coll., 2007). Le bevacizumab (Avastin®) est un AcM anti-VEGF. Il conduit à un taux de réponse en monothérapie qui reste faible, mais, associé au paclitaxel, il augmente significativement la survie sans rechute par rapport à la chimiothérapie seule (11 mois *versus* 6 mois) mais pas de la survie globale (Miller et coll., 2007).

II.3.2.3. Les inhibiteurs PARP et les mécanismes de réparation de l'ADN

La polymérase poly-ADP-ribose (PARP1) est une enzyme impliquée dans la réparation des cassures simple-brin (Bryant et coll., 2005; Farmer et coll., 2005). Or, inhiber les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN va potentialiser l'effet des agents de chimiothérapie. Les cancers du sein avec une mutation de BCRA1 présentent une altération de la réparation de la recombinaison homologue de l'ADN. De plus, elles sont fortement dépendantes d'autres formes de mécanismes de réparation de l'ADN telles que la réparation par excision de base impliquant PARP1. Le fait que les cancers présentant une mutation BRCA1 sont très liés à l'activité de PARP1, fait actuellement l'objet d'études cliniques avec des résultats prometteurs: le l'olaparib et le BSI-201 sont en cours d'évaluation en phase I pour le premier et en phase III pour le second (Fong et coll., 2009, Annunziata et coll., 2010).

II.3.3. Perspectives et conclusion

Ces différentes études de thérapie ciblée sont prometteuses, mais des études complémentaires sont nécessaires avant une application en routine clinique. Le traitement séquentiel par polychimiothérapie reste donc celui utilisé en routine malgré

les limites soulignées. Dans ce contexte, de nouvelles approches thérapeutiques comme la RIT, impliquant d'autres mécanismes de cytotoxicité que des agents de chimiothérapie ou les thérapies ciblées froides, semblent pertinentes dans le traitement du cancer du sein TN.

III. RADIOIMMUNOTHÉRAPIE (RIT)

III.1. Historique

Au début du 20^{ème} siècle, le chimiste allemand Paul Ehrlich proposait le terme de « magic bullets » pour décrire l'idée du système immunitaire ciblant sélectivement les récepteurs des microbes (Himmelweit et coll. 1960). Dans les années 50, Pressman et Korngold (Pressman et coll. 1953) ainsi que Bale et Spar (Bale et coll. 1957) ont réalisé le radiomarquage à l'iode 131 d'anticorps anti-récepteurs de tumeurs de rats et ont montré un ciblage tumoral sélectif. Vingt-cinq ans plus tard, les premières études cliniques ont démontré que les anticorps couplés à un radionucléide pouvaient s'accumuler sur la tumeur et la localiser sélectivement (Goldenberg et coll. 1978), suggérant le potentiel thérapeutique de cette technique appelée radioimmunothérapie ou RIT (Goldenberg et coll. 1981). En 1975, une nouvelle étape est franchie avec Kohler et Milstein qui ont offert à la communauté scientifique une nouvelle technique avec les hybridomes qui ont permis de créer de façon efficace des anticorps monoclonaux (AcM) contre une très grande variété d'antigènes (Köhler et coll. 1975). L'anticorps anti-ACE a été un des premiers anticorps à être utilisé chez les patients en particulier chez des sujets présentant des tumeurs exprimant l'ACE et on a pu démontrer que le ciblage tumoral était possible même en présence d'ACE circulant dans le sang alors que les tumeurs n'exprimant pas l'ACE n'étaient en revanche pas ciblées (Goldenberg et coll., 1978). Mais dans les années 80, les importantes réponses immunitaires anti-anticorps de souris (réponse HAMA) développées par les patients à la suite de traitements par anticorps monoclonaux de souris ont installé un scepticisme vis à vis de ce type de traitement. Le développement de la biologie moléculaire et de l'ingénierie génétique dans les années 90 a cependant donné un second souffle aux prédictions d'Ehrlich. En

effet, grâce à ces nouvelles méthodes, il est devenu possible de générer des anticorps chimériques souris-homme puis des anticorps humanisés (Figure 6).

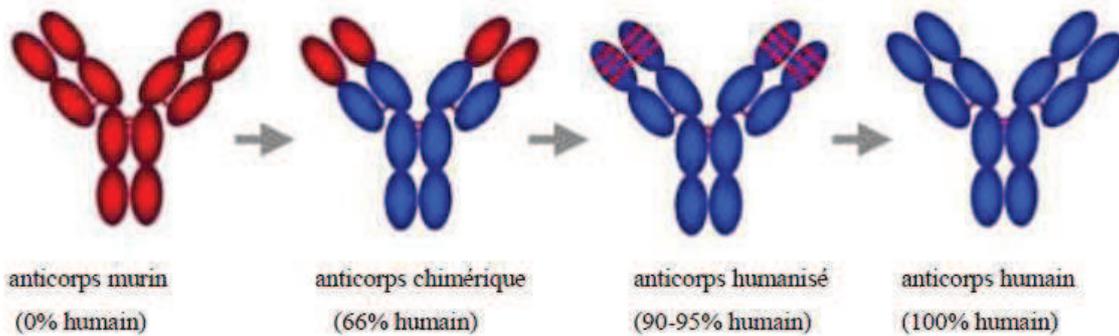


Figure 6 : Anticorps chimériques et humanisés. (d'après Goldenberg et coll., 2002)
Les domaines en pointillés appartiennent à l'anticorps de souris. Les CDRs sont schématisés par des cercles noirs ou pointillés respectivement pour l'anticorps humain et de souris

Des résultats thérapeutiques encourageants ont été obtenus par injection d'anticorps recombinants chimérisés non radiomarqués (ou froids) tels que le rituximab (Mabthera®) utilisé pour le traitement des lymphomes B folliculaires (McLaughlin et coll. 1998) ; ou humanisés tels que l'Herceptin® pour le cancer du sein (Cobleigh et coll. 1999). L'application thérapeutique des anticorps vecteurs de radioactivité pour la RIT a abouti dans les années 2000 à la mise sur le marché de deux AcM murins aux Etats-Unis, marqués l'un avec l'iode 131, l'autre avec l'yttrium 90 (ce dernier a aussi obtenu l'AMM en France), tous deux ciblant l'antigène CD20 et le lymphome malin non-Hodgkinien de phénotype B (Buechegger et coll. 2008).

III.2. Principe

La RIT est une forme de radiothérapie interne utilisant comme agent de vectorisation un AcM reconnaissant un antigène (Ag) exprimé par les cellules tumorales, couplé à un radionucléide (Goldenberg et coll. 2002). Son efficacité provient essentiellement de la radioactivité émise par ce radiopharmaceutique, qui provoque une irradiation à bas débit de dose, déposant une dose d'irradiation de façon hétérogène. L'AcM peut aussi contribuer à l'effet tumoricide par les différents mécanismes décrits à la figure 7. Lorsque les AcM sont radio-marqués, les cellules non directement ciblées peuvent être détruites par le mécanisme dit du « feu croisé » qui est une action à distance permise par le parcours des particules dans la matière vivante (de la centaine de micromètres au centimètre suivant le type de rayonnement) et qui ne s'observe pas lorsque les anticorps armés à l'aide de composés chimiothérapeutiques ou de toxines sont utilisés (Barbet et coll., 2008).

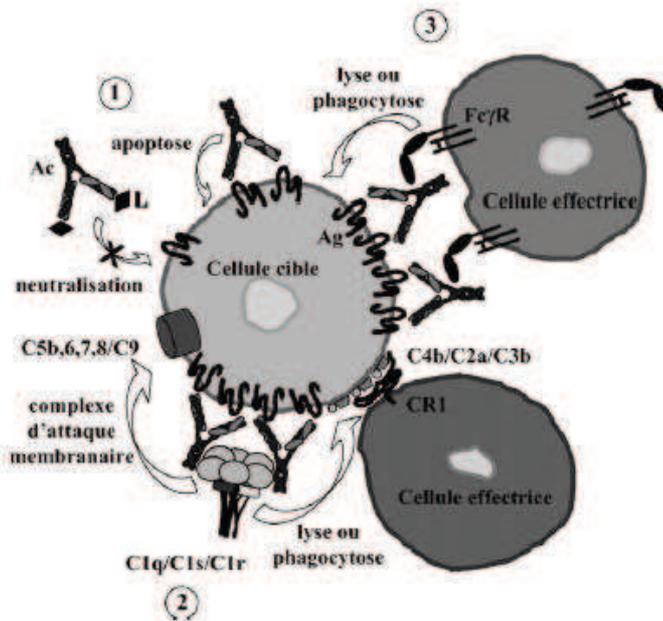


Figure 7 : Les différents modes d'action des anticorps

(d'après Janeway et coll., 2004)

1. *Neutralisation par fixation directe*
2. *Activation des protéines du complément par fixation de C1q*
3. *Opsonisation en recouvrant le pathogène et en induisant par fixation sur différents récepteurs Fc la phagocytose par les macrophages ou les neutrophiles ou en activant des cellules tueuses telles que les cellules NK (Natural Killer), les éosinophiles, basophiles, ...*

III.3. Paramètres déterminant l'efficacité de la RIT

L'efficacité et la toxicité de la RIT dépendent du choix de l'AcM, de l'Ag, du radioélément (Figure 8). Ces facteurs conditionnent la dose absorbée ainsi que l'homogénéité du dépôt de dose et le débit de dose (Stigbrand et coll., 1996). Les caractéristiques de la tumeur en particulier sa radiosensibilité est un facteur qui, lui, influence la réponse tumorale au traitement. Nous allons développer chacun de ces points.

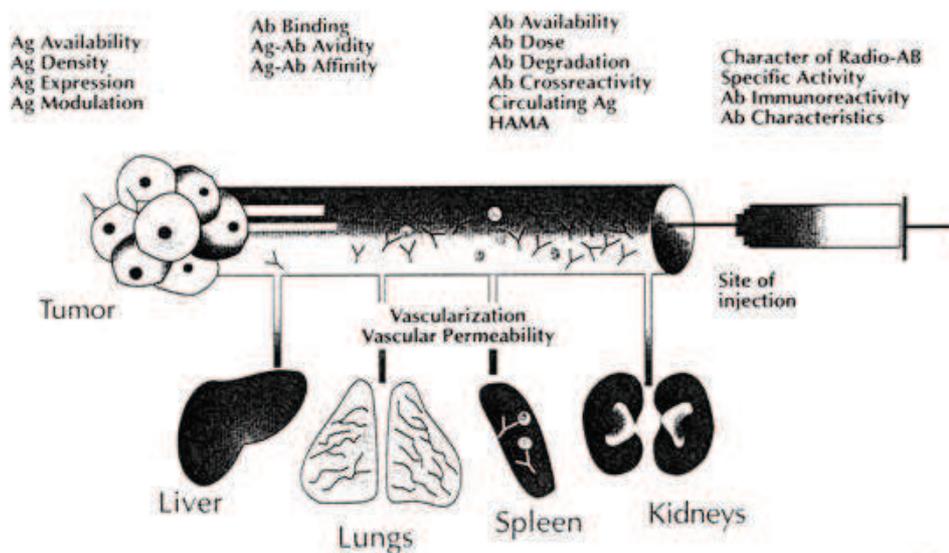


Figure 8 : Facteurs déterminants l'efficacité de la RIT (d'après Stigbrand et coll., 1996)

III.3.1. Anticorps (AcM)

La spécificité, l'affinité, la forme et la dose de l'AcM déterminent en partie sa biodistribution. L'affinité conditionne la solidité de la liaison Ag-AcM et la rétention de l'immunoconjugué dans la cible. C'est pourquoi elle doit être suffisamment importante. Toutefois, il a été montré dans un modèle *in vitro* de sphéroïdes multicellulaires tumoraux qu'un AcM de faible affinité pénétrait plus profondément qu'un AcM de haute affinité (Langmuir et coll., 1992). Le consensus général est néanmoins d'utiliser des AcM de haute affinité afin d'améliorer le ciblage. Plusieurs AcM, d'affinités différentes,

dirigés contre des épitopes de l'Ag glycoprotéique et pan-carcinomique TAG-72 ont été ainsi développés (Kuroki et coll., 1990). Un des premiers, le B72.3, avait une constante d'affinité de $2,5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$. Une seconde génération d'AcM de haute affinité appelés CC a ensuite été développée (CC92, CC49 et CC83). Une étude immunohistochimique confirmait une réactivité comparable de B72.3 et CC49 pour les tissus adultes normaux mais une supériorité de CC49 en terme de pourcentage de cellules carcinomateuses reconnues et d'intensité de la quantité d'anticorps fixée par cellule (Molinolo et coll., 1990). De même, chez l'animal, la fixation tumorale était 1,4 à 5,4 fois meilleure avec les AcM CC par rapport à B72.3 et les rapports tumeur sur tissus normaux nettement supérieurs (Colcher et coll., 1988).

La forme de l'AcM, immunoglobuline de classe G (IgG) entière ou fragmentée, modifie également son comportement dans l'organisme et son accès à la tumeur (Figure 9).

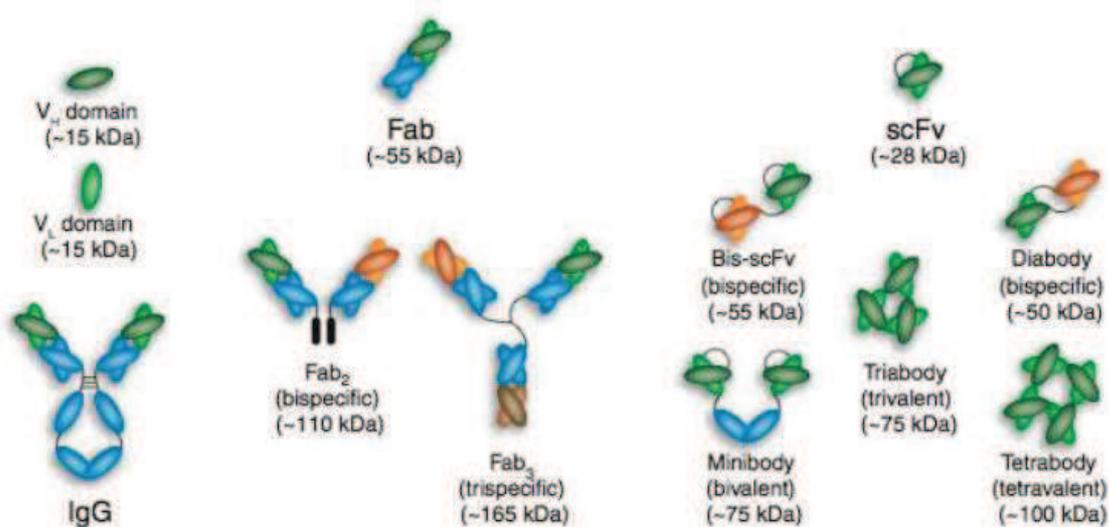


Figure 9 : Les différents formats d'anticorps

(d'après Holliger et coll., 2005)

Les fragments Fab et F(ab)' sont également obtenus respectivement par digestion à la papaïne et la pepsine d'une IgG entière. Le Fv correspond à l'association non covalente d'un domaine variable VH à un domaine variable VL. Le scFv est une molécule monocaténaire où le VH est relié au VL par un peptide de liaison. Le V_HH est le plus petit domaine connu capable de lier un antigène avec une bonne affinité.

La comparaison de la pharmacocinétique et de la biodistribution de ces différentes formes a fait l'objet de nombreuses études précliniques (Schott et coll., 1992, Stein et coll., 1994). Dans la majorité des modèles, la fixation tumorale et le temps de résidence sont supérieurs avec l'IgG entière qu'avec l'IgG fragmentée (Tableau 2). Les simples chaînes (25 000 Da) et les diabodies (50 000 Da) bivalents, au temps de rétention tumoral assez long, semblent être des alternatives intéressantes à l'IgG intacte (Olafsen et coll., 2010). L'IgG entière a cependant plus de difficultés à atteindre sa cible tumorale et à y pénétrer. Une étude *in vitro* dans un modèle de sphéroïdes multicellulaires montrait un parcours dans la cible plus profond avec les fragments (Sutherland et coll., 1987). De même, dans un modèle de greffe animale, les IgG intactes restaient concentrées au voisinage des vaisseaux tumoraux alors que les fragments ScFv diffusaient plus profondément (Yokota et coll., 1992). Par ailleurs, les rapports tumeur sur organes sains sont plus faibles avec les IgG intactes qu'avec les fragments, notamment au niveau hépato-splénique. En effet, les macrophages expriment des récepteurs membranaires pour la partie Fc des IgG et le foie participe au métabolisme des AcM. La clairance sanguine des IgG est plus lente, ce qui augmente les risques d'irradiation non spécifique, en particulier médullaire causant une toxicité hématologique avant que la dose tumoricide ne soit atteinte (Colcher et coll., 1998, Massuger et coll., 1991, Stein et coll., 1994). L'utilisation de fragments présente d'autres inconvénients. On retrouve après administration intraveineuse (i.v.) de fragments Fab' ou sFv une fixation rénale précoce importante (Schott et coll., 1992, Koziol et coll., 1995) probablement due à une différence de poids moléculaire et de charge des immunoconjugués plutôt qu'à une différence d'affinité. En effet, les fragments perdent les parties carbohydratées chargées négativement présentes sur la partie Fc des Ig entières. Cela représente un désavantage pour ces molécules surtout si elles sont liées à un radioélément qui est réabsorbé et retenu par les reins comme les radiométaux. Behr et coll. ont préconisé l'administration d'une haute dose d'acides aminés avant l'administration de l'AcM radiomarqué pour réduire de manière significative la réabsorption tubulaire rénale d'un fragment d'AcM (Fab') marqué à un radiométal (Behr et coll., 1997). Cette approche a été proposée dans les essais cliniques mais elle n'est pas suffisante pour éviter la toxicité rénale bien que la réduisant de moitié et une

surveillance de la fonction rénale à long terme chez ces patients semble nécessaire (Vegt et coll., 2010). Le fait qu'il existe une clairance sanguine rapide des fragments, ce qui est un avantage pour la radioprotection des tissus sains en particulier la moelle et permet une escalade des activités administrées, entraîne une diminution du temps de résidence du fragment et donc une dose absorbée moindre par la tumeur. Par conséquent, l'escalade des activités administrées ne permet pas toujours de délivrer des doses d'irradiation à la tumeur plus élevées alors qu'une fixation à long terme de l'AcM est plus cytotoxique car la dose d'irradiation est alors plus élevée (Behr et coll., 1998).

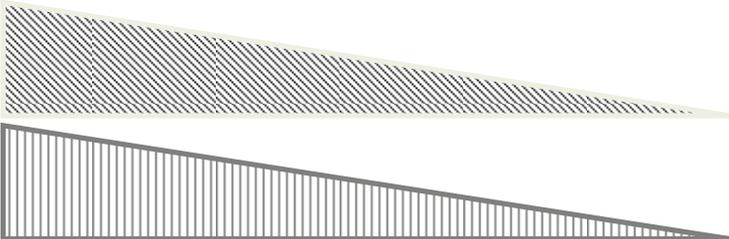
	IgG	F(ab') ₂	Fab'	scFv
Propriétés physiques				
Poids moléculaire estimé (kDa)	150	100	50	25
Propriétés biologiques				
Demi-vie biologique dans le sang*	1-4 jours	1-2 jours	3 h	4 min
Organe cible	Foie	Foie	Reins	Reins
Fixation tumorale				
**Intensité de fixation				
**Durée de fixation				
Temps d'accumulation optimal	Jour(s)	Jour(s)	Heure(s)	Heure(s)

Tableau 2 : Propriétés de ciblage des formes différentes d'anticorps
(d'après Goldenberg et coll., 2011)

*Demi-vie de l'AcM dans le sang
scFv : Single-chain Fv fragment

III.3.2. Antigène (Ag)

Idéalement, l'Ag cible doit être non sécrété, exprimé fortement, de façon constante et homogène à la surface des cellules cancéreuses et à l'exclusion d'autres tissus (Goodwin et coll., 1991). En fait, les Ag, sauf exceptions, ne sont pas spécifiques d'une tumeur. Ils peuvent être exprimés de façon physiologique par certains tissus ou au cours de processus pathologiques variés comme l'inflammation. Toutefois, la cellule cancéreuse les exprime en concentration beaucoup plus importante. Il s'agit donc d'une spécificité quantitative. De plus, l'expression varie entre les cellules d'une même tumeur et entre deux masses tumorales chez un même individu, par exemple la tumeur primitive et une métastase. Différentes classes d'Ag tumoraux ont été utilisées pour la RIT : i) des Ag oncofoetaux comme l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) ou l'alphafoetoprotéine (AFP) ; ii) des récepteurs de facteurs de croissance comme HER2 ; iii) des marqueurs de différenciation des carcinomes comme MUC-1 ; iv) des marqueurs de différenciation des leucocytes comme le CD20, CD22, la liste n'étant pas exhaustive. La localisation de l'Ag doit être prise en considération, notamment pour le choix du radioélément. En effet, s'il se situe au niveau du noyau cellulaire, un émetteur avec un petit parcours (e- Auger) est adapté pour obtenir un dépôt d'énergie maximal au niveau du noyau. Mais, se pose alors le problème de l'accessibilité de l'Ag. Si l'Ag est exprimé sur la membrane cellulaire, un émetteur avec un parcours plus long apparaît préférable. Ces critères sont relativement théoriques, des signalisations d'origine membranaires intervenant dans les mécanismes de mort cellulaire, notamment dans l'induction d'apoptose. La capacité du complexe Ag-AcM à induire une endocytose est également à prendre en compte (Press et coll., 1989). La modulation antigénique a une importance particulière lorsque l'iode 131 est utilisé, les AcM radio-iodés pouvant subir une deshalogénéation à l'intérieur des cellules, avec une libération rapide de l'atome d'iode radioactif. Le temps de rétention et la dose dans la tumeur sont alors moindres. L'AcM marqué par l'yttrium 90 ou plus généralement un radiométal subit aussi une dégradation enzymatique intra-cellulaire, mais contrairement à l'iode, l'atome de radiométal reste dans le compartiment lysosomal de la cellule.

La quantité d'Ag présente dans la circulation peut aussi théoriquement modifier le comportement pharmacocinétique de l'AcM et l'efficacité de la RIT. Des résultats

contradictoires ont cependant été obtenus chez l'animal et l'Homme. La pharmacocinétique et la biodistribution de deux AcM, OC125 qui reconnaît un Ag sécrété et OVTL3 un Ag non sécrété, ont été comparées dans un modèle animal de tumeur ovarienne (Moseley et coll., 1988). La fixation tumorale était moindre avec l'OC125, vraisemblablement du fait de la présence d'Ag circulant et dans l'ascite des souris, formant avec l'AcM des complexes immuns rapidement séquestrés et dégradés dans le foie et la rate. Cependant, une revue des données de la littérature concluait que, chez l'Homme, la présence d'Ag circulant n'affectait pas significativement le ciblage tumoral, à la différence des modèles animaux (Pimm et coll., 1995). Une étude plus récente a montré que des anticorps humanisés anti-ACE présentaient *in vitro* une faible complexation à l'ACE circulant (Garambois et coll., 2004). L'hypothèse d'une différence conformationnelle entre forme circulante et forme liée a été émise pour expliquer cette absence d'interaction (Bosslet et coll., 1988 ; Stewart et coll., 1999).

III.3.3. Radioélément

Les effets de la RIT, comme pour toutes les formes de radiothérapie interne, dépendent aussi des propriétés physiques (nature, énergie, parcours, période physique), de la structure chimique et du comportement biologique du radioélément qui modifient la biodistribution et déterminent les doses d'irradiation. Les émetteurs béta- utilisés en RIT peuvent déposer leur énergie sur quelques millimètres de tissu ou sur une distance équivalente aux diamètres de 50 à 200 cellules. Les AcM couplés aux émetteurs béta- qui ont un ciblage tumoral lent avec une persistance dans la circulation sanguine de quelques jours conduisent à une toxicité hématologique accrue ce qui limite l'activité radioactive qui peut être administrée. L'iode 131 a été le premier radioélément utilisé bien que ses propriétés physiques ne soient pas très favorables, notamment en terme de radioprotection. Aujourd'hui d'autres émetteurs béta- sont préférés, comme le lutétium 177 (^{177}Lu) dont les propriétés physiques sont proches de celles de l'iode 131 mais plus favorables pour la radioprotection ou l'yttrium 90 (^{90}Y) de période plus courte mais plus énergétique. Marion de Jong a montré dans des études précliniques évaluant les analogues de la somatostatine marqués que le ^{177}Lu était adapté pour des tumeurs de quelques mm et l' ^{90}Y de quelques dizaine de mm. (de Jong et coll., 2005).

Les émetteurs alpha avec leur faible parcours dans la matière (50-80 μm) sont des « tueurs de cellules » potentiellement meilleurs que les émetteurs béta-. Ils sont particulièrement adaptés aux tumeurs du sang comme la leucémie ou tumeurs disséminées dans la moelle osseuse (Myélome multiple, cancer de la prostate) car ils ciblent alors des cellules isolées ou sous forme de clusters. Ces cancers sont, de plus, rapidement accessibles aux AcM radiomarqués injectés en I.V. ce qui est important en raison de la période physique brève de ces radioéléments qui doivent pouvoir cibler les cellules tumorales rapidement. Les émetteurs sont aussi utilisés pour traiter les implants péritonéaux (micro-nodules) du cancer de l'ovaire ou la maladie résiduelle post-chirurgicale des tumeurs cérébrales.

Les émetteurs d'électron Auger (125I, 111In et 67Ga) ont un parcours dans la matière plus court par rapport à celui des émetteurs alpha et sont capables de tuer des cellules uniques ce qui réduit les dommages causés aux tissus sains environnants.

Une « utilisation adaptée » des ces différents radioéléments doit être envisagée pour augmenter la probabilité de destruction cellulaire tumorale en RIT. En effet, il est possible d'envisager la co-administration d'un AcM marqué avec un radioélément à parcours relativement long dans la matière pour traiter des tumeurs de petites tailles jusqu'à la limite de la visibilité et d'un AcM marqué avec un radioélément, cette fois, avec un parcours court pour cibler la maladie microscopique qui n'aurait pas été détruite par l'émetteur béta- (Mulford et coll., 2005, Mattes et coll., 2002, Chérel et coll., 2006). Le tableau 3 résume les propriétés physiques des différents radioéléments présentant un intérêt pour la RIT.

Par ailleurs, la période physique du radioélément doit être considérée et adaptée à la période biologique de l'AcM (Mausner et coll., 1993). Un radioélément à période plus courte sera adapté si la fixation tumorale est obtenue rapidement après l'injection du traceur, ce qui est le cas avec un fragment d'AcM ou un peptide préciblé. Si le 177Lu et le 67Cu sont proches d'un point de vue énergétique, la période du cuivre est plus courte et plus adaptée pour des fragments.

Le marquage d'un AcM peut être réalisé directement ou par l'intermédiaire d'un ligand bifonctionnel, possédant des fonctions de couplage avec l'AcM et de complexation avec le radioélément. Le radiopharmaceutique obtenu doit posséder la meilleure stabilité *in*

vitro mais surtout *in vivo* possible. Le marquage à l'iode 131 est réalisé directement par l'intermédiaire de résidus tyrosine. Le marquage avec des radioisotopes métalliques (^{111}In , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{213}Bi , ^{67}Cu) est effectué indirectement et de nombreux ligands dérivés du DOTA et du DTPA ont été synthétisés afin d'obtenir des chélates de grande stabilité et non immunogènes (Goldenberg et coll., 2010).

	Période physique	Emission thérapeutique	Energie maximale MeV	Parcours maximal
¹³¹Iode	8,0 j	β	0,61	2,3 mm
¹⁷⁷Lutétium	6,7 j	β	0,50	1,8 mm
⁹⁰Yttrium	2,7 j	β	2,28	11,3 mm
⁶⁷Cuivre	2,6 j	β	0,58	2,1 mm
²¹³Bismuth	0,8 h	α	5,86	60-85 μm
²¹¹Astatine	7,2 h	α	6,8	-
²²⁵Actinium	10 j	α	5,83	-
¹²⁵Iode	60,5 j	e ⁻ Auger	-	2-500 nm

Tableau 3 : Propriétés physiques des radioéléments présentant un intérêt pour la RIT (d'après Kassis et coll., 2008)

III.3.4. Caractéristiques de la tumeur

III.3.4.1. Radiosensibilité tumorale

Un fort contraste existe entre les performances de la RIT dans le lymphome non Hodgkinien (LNH) et les résultats obtenus pour les tumeurs solides moins radiosensibles (Goldenberg et coll., 2010). Le traitement par irradiation externe requiert plus de 60 Gy pour stériliser une tumeur solide ce qui laisse présager des difficultés à utiliser la RIT contre celle-ci.

L'irradiation délivrée par la RIT ne peut être comparée à celle délivrée par la radiothérapie externe. La RIT, comme les autres formes de radiothérapie interne vectorisée (RIV), délivre une irradiation à bas débit de dose, continue et prolongée, conditionnée par la biodistribution de l'anticorps radio-marqué. C'est une forme de thérapie ciblée mais à la différence des thérapies froides utilisant des anticorps non marqués, les cellules tumorales qui ne fixent l'anticorps peuvent être détruites par le phénomène de « feu croisé » lorsque les émissions radioactives ont un parcours d'au moins quelques diamètres cellulaires (Wheldon et coll., 1990).

En radiothérapie externe, l'irradiation est délivrée sous forme fractionnée, avec des doses intermittentes et des débits de doses élevés (de l'ordre de 60 Gy/h). La RIV constitue une modalité radicalement différente, et les conséquences radiobiologiques ne sont pas comparables (Kassis et coll., 2005). En raison du bas débit de dose, la RIV permet une plus grande efficacité des mécanismes de réparation cellulaire et l'efficacité théorique est inférieure de 20 % environ à celle de la même dose délivrée en radiothérapie externe (Fowler et coll., 1990).

Néanmoins, des perspectives très séduisantes s'ouvrent depuis quelques années avec les travaux montrant que les bas débits de dose n'agissent pas seulement directement sur les cellules directement irradiées, mais aussi en induisant des phénomènes secondaires ; il faut en particulier insister sur l'instabilité génétique radio-induite et sur les effets de voisinage des cellules irradiées sur les cellules non directement irradiées (« bystander effect ») (Mothersill et coll., 2006 ; Prise et coll., 2007).

De plus, il semble même que l'irradiation de cellules tumorales *in vivo* puisse avoir des effets à distance, en impliquant les mécanismes du système immunitaire. Cette action systémique pourrait dans certains cas induire la régression de lésions tumorales à distance de celles irradiées. Ce phénomène est appelé « effet abscopal » (Kaminski et coll., 2005).

A côté du volume et du statut physiologique et nutritionnel de la tumeur, il est important de distinguer plusieurs paramètres conditionnant la sensibilité cellulaire ou plus généralement la réponse tumorale aux rayonnements ionisants. Il existe une corrélation entre vitesse de croissance et réponse à l'irradiation : les métastases à croissance rapide répondant mieux que celles à croissance lente. Les cellules quiescentes semblent plus radio-résistantes que celles en prolifération et la proportion de cellules quiescentes augmente avec la taille de la tumeur (Shipley et coll., 1975). La proportion de cellules clonogènes, variable d'une tumeur à l'autre, conditionne également la radiosensibilité. Il faut évoquer aussi la radiosensibilité intrinsèque qui reflète la capacité des cellules à réparer les lésions potentiellement létales ou sublétales radio-induites. La concentration intracellulaire en superoxyde dismutase, catalase, GSH ou des molécules comportant des groupements thiols conditionnent vraisemblablement les capacités de réparation, ces enzymes neutralisant les radicaux formés à la suite de l'irradiation (Pouget et coll., 2001). Des expériences de transfection ont montré le rôle de certains oncogènes. Par exemple, les oligomères anti-sens de *c-raf* par exemple neutralisent la radiorésistance (Kasid et coll., 1989). Enfin, la puissance des contacts inter-cellulaires joue certainement un rôle dans les phénomènes de réparation. La radiosensibilité intrinsèque varie entre les différents types histologiques mais aussi au cours de la croissance d'une tumeur.

III.3.4.2. Accès à la tumeur

De nombreuses barrières s'opposent au transport de l'immunoconjugué du compartiment vasculaire vers le compartiment interstitiel puis vers le compartiment cellulaire, notamment dans les tumeurs volumineuses. (Jain et coll., 1988 et 1991). A la différence de la vascularisation des tissus normaux, la vascularisation tumorale est très hétérogène et anarchique, les vaisseaux sont dilatés, sacculaires, fenêtrés et tortueux

(Figure 10).

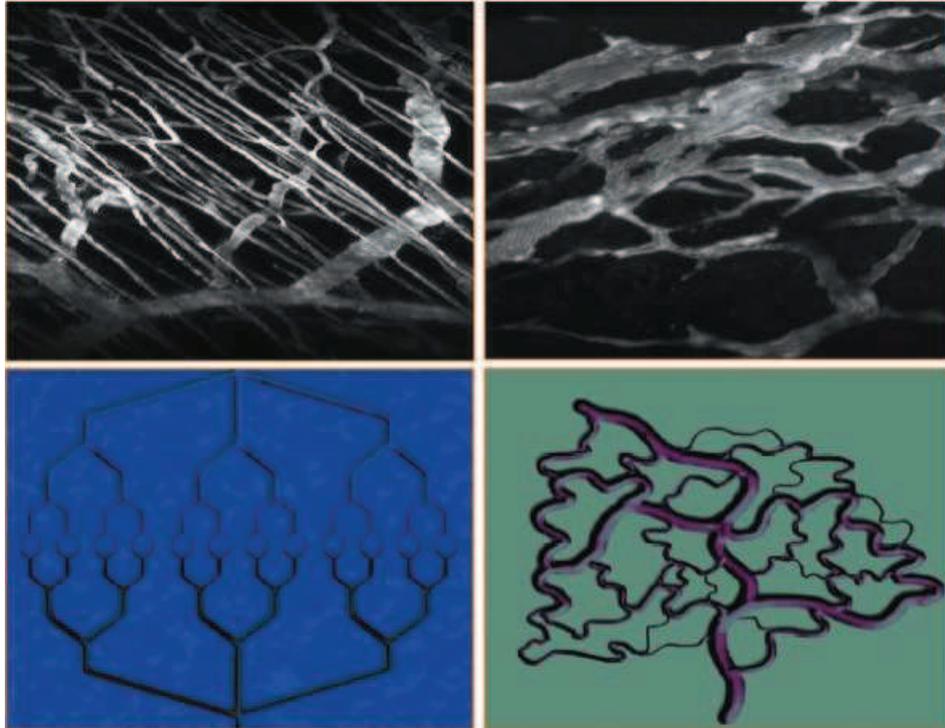


Figure 10 : Vascularisation tumorale

Aspect normal (à gauche) et anormal (à droite) de la vascularisation en microscopie électronique à balayage et selon une représentation schématique.

(d'après Ravaud et coll., 2007)

Les vaisseaux tumoraux se distinguent des vaisseaux normaux par une morphologie plus tortueuse, un calibre irrégulier (présence de nombreuses zones dilatées).

Le volume vasculaire varie de 1 à 20 % en fonction de la nature et de la taille de la tumeur. Le flux sanguin tumoral moyen est inférieur à celui des tissus normaux et

diminue lorsque la tumeur augmente de taille (Jain et coll., 1988). En revanche, l'hétérogénéité de ce flux s'accroît avec la croissance tumorale. La zone centrale, nécrotique n'est pas vascularisée, donc peu accessible aux AcM contrairement à la zone périphérique. Ces données peuvent être illustrées par des autoradiographies de tumeurs, mettant en évidence des zones de forte densité optique, périphériques, voisines de zones faiblement denses, au centre (Fand et coll., 1986). A l'échelle microscopique, on retrouve également un flux sanguin intermittent. Ces éléments participent à la distribution hétérogène de la macromolécule.

Quand l'AcM arrive dans le capillaire, il traverse la paroi du vaisseau par des mécanismes de diffusion/convection. La diffusion est efficace, du fait de la structure de la paroi, caractérisée par l'absence de membrane basale et la présence d'espace entre les cellules endothéliales. En revanche, la convection, mécanisme prépondérant d'extravasation des AcM, est peu efficace. En effet, ce phénomène est proportionnel à la surface d'échange et aux différences de pressions hydrostatique et osmotique entre les compartiments vasculaires et interstitiels. Du fait de l'absence de vaisseaux lymphatiques, la pression interstitielle est supérieure dans la tumeur par rapport aux tissus sains et plus faible en périphérie tumorale où elle approche des valeurs physiologiques. Il en résulte une diminution de l'extravasation des AcM et de leur fixation dans la cible, d'autant plus importante que la tumeur est volumineuse, la surface d'échange étant inversement proportionnelle à la taille. Le transport de l'AcM de l'interstitium vers les Ag s'effectue aussi par un mécanisme de diffusion et de convection. Malgré la faible concentration de l'interstitium en molécules polysaccharidiques ralentissant le mouvement des macromolécules, le transport dans le liquide interstitiel est gêné par le volume important de l'espace et le gradient de pression hydrostatique (Rudnick et coll., 2009).

III.3.4.3. Masse tumorale

L'ensemble de ces données explique que les cibles idéales pour la RIT comme pour la radiothérapie interne vectorisée en général sont les tumeurs de petite taille voire la maladie résiduelle métastatique (Juweid et coll., 1996). Administrée à un stade précoce de métastases, la RIT chez l'animal et chez l'homme a pu modifier significativement la

survie (Liersch et coll., 2005) et même obtenir des réponses complètes (Blumenthal et coll., 1992). Une taille de plus de 5 cm semble en revanche être un obstacle à l'efficacité de cette thérapeutique (Barbet et coll., 2008).

D'ailleurs, l'efficacité de l'iode ¹³¹ dans le traitement des carcinomes différenciés de la thyroïde est nettement meilleure pour les lésions pulmonaires microscopiques, avec un taux de réponse de 83 % que pour les lésions macroscopiques, avec un taux de réponse de 14 % (Schlumberger et coll., 1996). La perfusion tumorale, insuffisante lorsque la tumeur grossit et atteint quelques grammes, n'autorise qu'une fixation faible et hétérogène des AcM et du fait de l'installation d'une hypoxie, les cellules sont plus radiorésistantes (Jain et coll., 1988, Chatal et coll., 1989, Brown et coll., 1998). La combinaison des deux phénomènes conduit à des conditions défavorables pour l'efficacité de la RIT. La figure 11 schématise ses données. La situation idéale pour appliquer la RIT des tumeurs solides est donc le stade de maladies microscopiques non détectables ou maladie résiduelle.

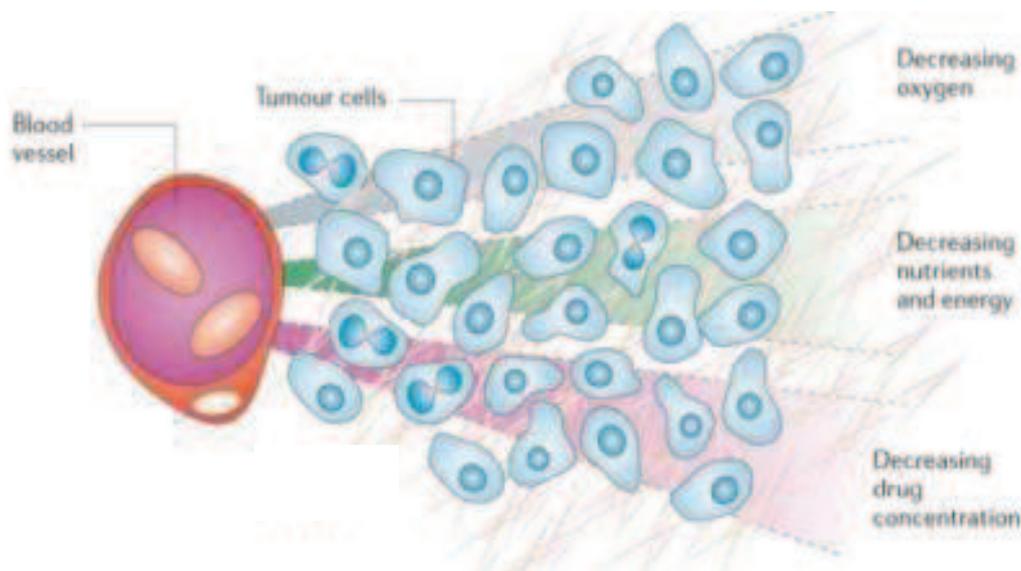


Figure 11 : Physiopathologie tumorale (d'après Minchinton et coll., 2006)

III.4. Optimisation de la RIT

De nombreuses voies d'optimisation de la RIT ont été explorées (Slavin-Chiorini et coll., 2000). Le but est d'augmenter la dose absorbée par la tumeur tout en maintenant une irradiation acceptable des tissus sains. Différentes stratégies ont été développées pour améliorer les rapports de fixation tumeur/tissus sains des AcM ou réduire leur immunogénéicité, dans le but de répéter les injections. La RIT préciblée, semble être une des approches les plus prometteuses (Pagel et coll., 2009). Quelque soit la méthode de ciblage, la répétition des cures de RIT sera néanmoins probablement indispensable pour obtenir une efficacité satisfaisante.

III.4.1. Augmentation de la fixation tumorale

III.4.1.1. Augmentation du flux sanguin et réduction des pressions intra-tumorales

Des agents physiques et chimiques sont capables d'augmenter, au moins transitoirement, le flux sanguin et la perméabilité vasculaire ou de réduire la pression interstitielle intra-tumorale. Des expérimentations animales ont montré que le couplage d'un AcM reconnaissant les régions nécrotiques, le TNT-1, avec différentes substances vasoactives (IL-1 β , IL-2, TNF α , leucotriène B4, histamine, bradykinine) augmentait la fixation tumorale sans modifier la fixation non spécifique (Khawli et coll., 1994). Les couplages TNT-1/IL2 et TNT-1/histamine modifiaient la vasoperméabilité ; les couplages TNT-1/leucotriène B4 et TNT-1/ bradykinine modifiaient le volume sanguin ; et les associations TNT-1/IL1 et TNT-1/TNF conjuguèrent les deux effets. La fixation tumorale était également augmentée par d'autres mécanismes comme l'induction d'hyperthermie, des irradiations locales ou l'utilisation de molécules comme l'angiotensine II (Burton et coll., 1988, Wilder et coll., 1993). Ces approches sont limitées, les modifications ne s'appliquant pas aux zones mal vascularisées, nombreuses dans les tumeurs de grande taille.

III.4.1.2. Augmentation de l'expression antigénique

Certaines cytokines, comme l'interféron α , augmentent l'expression antigénique des

cellules cancéreuses par dérégulation des facteurs intracellulaires inhibant cette expression (Guadagni et coll., 1991). Certaines équipes (De Nardo et coll., 1991) ont multiplié, avec l'IL-2, d'un facteur supérieur à 2 la fixation tumorale d'un AcM marqué au cuivre 67. L'effet de cytokines sur l'expression antigénique a aussi été étudié *in vitro* dans des modèles de sphéroïdes multicellulaires de cancers ovariens (Imbert-Marcille et coll., 1994). Les résultats étaient modestes avec des cytokines isolées, plus encourageants en les associant.

III.4.2. Diminution de l'irradiation non spécifique

Une fixation non spécifique des AcM trop importante entraîne la non sélection de l'AcM pour la RIT. Une fixation au niveau des sites de catabolisme (foie, rate ou rein) peut être néanmoins observée. L'irradiation non spécifique provient essentiellement de paramètres pharmacocinétiques avec une élimination lente des AcM. Les tissus sains sont alors exposés à l'activité présente dans le sang et dans les fluides biologiques. Un relargage avec fixation du radio-isotope au niveau des tissus sains, comme c'est le cas avec l'yttrium 90 dans le tissu osseux, peut également participer à une irradiation non spécifique. L'irradiation des tissus normaux peut être réduite par l'utilisation de nouveaux ligands permettant un marquage plus stable, des techniques de ciblage en deux ou trois temps.

III.4.2.1. Réduction de l'anticorps en excès

Les méthodes de plasmaphérèse, l'utilisation externe de colonnes d'anti-anticorps ou l'injection d'AcM anti-idiotypiques permettent d'éliminer l'AcM radioactif circulant non fixé sur la cible tumorale (Martensson et coll., 2007).

III.4.2.2. Administration d'AcM froids

L'administration préalable d'AcM froids peut permettre de modifier le ciblage tumoral. Chez les patients atteints de lymphomes malins non hodgkiniens, l'administration préalable d'AcM anti-CD20 améliore en général la biodistribution de l'AcM radio-marqué. Un plus grand nombre de sites tumoraux connus est visualisé et la fixation non spécifique dans la rate et le squelette pelvi-rachidien réduite (Knox et coll., 1995).

III.4.2.3. Pré-ciblage et anticorps bispécifique

Pour réduire la fixation non spécifique, les systèmes de ciblage en plusieurs étapes, encore appelé pré-ciblage, sont particulièrement intéressants (Barbet et coll., 1999 ; Goldenberg et coll., 2006 ; Goldenberg et coll., 2008).

Ces systèmes consistent à injecter dans un premier temps un immunoconjugué non radioactif possédant une double spécificité, l'une envers un Ag tumoral, l'autre envers une molécule de bas PM. Cet immunoconjugué se fixe sur la cible par son site de liaison anti-Ag tumoral. Le deuxième temps intervient après l'élimination physiologique des molécules d'immunoconjugués présentes dans le sang et les tissus normaux. Une molécule radiomarquée de bas PM est alors injectée. Elle va diffuser rapidement du fait de sa petite taille, vers sa cible c'est à dire l'immunoconjugué pré-localisé sur la tumeur et être éliminée rapidement du sang et des tissus normaux. La technique AES « Affinity Enhancement System » est la technique de pré-ciblage ayant atteint le stade le plus avancé du développement clinique. Cette technique mise au point par la société Immunotech (Marseille) et actuellement développée par la société IBC pharmaceuticals (Morris Plain, New Jersey) associe un anticorps bispécifique (AcBs), anti- Ag tumoral / anti-haptène, et un haptène bivalent radio-marqué de PM inférieur à 1000. La bivalence de l'haptène est déterminante, permettant une liaison entre deux AcBs pré-localisés à la surface des cellules tumorales. Cette coopérativité rend les complexes radioactifs formés à la surface des cellules plus stables que dans le plasma et les liquides interstitiels. L'affinité entre l'AcBs et l'haptène est modeste dans le sang et les tissus normaux et forte dans la tumeur (Barbet et coll., 1999). De plus, la bivalence améliore la fixation tumorale, l'AcBs circulant jouant le rôle d'un transporteur réversible et prolongeant la demi-vie sérique de l'haptène. La fraction de l'haptène complexée à un seul AcBs peut se lier aux sites tumoraux libres, ce qui n'est pas possible avec un haptène monovalent. Les études précliniques ont démontré une amélioration du contraste des images avec l'approche AES par rapport à des AcM directement marqués ; la RIT permettait de délivrer des doses tumorales supérieures avec une efficacité thérapeutique augmentée (Kraeber-Bodéré et coll., 1999). En clinique, des résultats prometteurs en terme d'efficacité ont été rapportés dans des essais de phase I et II

dans le CMT ou d'autres tumeurs ACE positives (Kraeber-Bodéré et coll., 2006 ; Chatal et coll., 2006 ; Walter et coll., 2012 ; Salaun et coll., 2012). Aujourd'hui des systèmes de préciblage de nouvelles générations avec des AcBs recombinants humanisés trivalents, comme l'AcBs anti-ACE TF2, et des peptides HSG comme l'IMP-288 ont été développés. Les réactifs sont à l'étude en clinique pour des applications de RIT. Des études animales ont démontré leurs propriétés très favorables pour l'immuno-TEP (Rossi et coll., 2006 ; Karacay et coll., 2005 ; McBride et coll., 2006).

III.4.3. Diminution de l'immunogénécité des AcM

L'injection d'AcM d'origine murine, chez l'homme, entraîne la production d'anticorps anti-souris HAMA "Human Anti-Mouse Antibody", dirigés contre leurs parties constantes ou variables (Tilyou et coll., 1990 ; Goldenberg et coll., 1992). Ces HAMA apparaissent surtout en cas d'injection d'une quantité supérieure au milligramme ou d'injections répétées. Une immunisation contre le ligand utilisé pour le marquage (notamment le DOTA) peut aussi être observée (Kosmas et coll., 1992). La présence de HAMA modifie la pharmacocinétique des AcM radio-marqués, réduit leur disponibilité pour la cible tumorale en entraînant la formation de complexe AcM-HAMA rapidement éliminés (Murray et coll., 1994). Parmi les patients une grande variabilité existe à développer ou non une réponse HAMA (Sears et coll., 1982). Les anticorps chimériques et humanisés ainsi que les minibodies ou diabodies génèrent moins de réponse HAMA. Les HAMAs peuvent être détectés dès une semaine après l'administration de l'anticorps murin et peut persister des mois voire des années. En présence d'HAMA, l'expérience montre que les injections causent rarement des problèmes cliniques si l'injection est lente. En revanche, les HAMAs sont fréquemment la cause de l'arrêt de la RIT car l'AcM ne peut plus atteindre sa cible. Etant donné l'effet thérapeutique favorable obtenu en général en fractionnant et en répétant les cures de RIT, plusieurs équipes tentent de réduire l'immunogénécité en utilisant des AcM fragmentés, chimériques ou humanisés et produits par génie génétique (Figure 9). La biodistribution des AcM humanisés ou chimériques diffère de celle des AcM murins et est donc à ré-évaluer dans chaque cas (Meredith et coll., 1991, Buccheger et coll., 1992). Par ailleurs il existe probablement une différence d'affinité des récepteurs exprimés à la surface des cellules humaines

pour les immunoglobulines murines et chimères. Il faut souligner également la possibilité d'une immunisation contre les AcM humanisés avec l'apparition dans le sérum des patients de HAHA "Human Anti-Human Antibody". Dans une étude clinique de phase I évaluant l'IgG4 chimérique de l'AcM B72.3 (anti-TAG-72), presque la moitié des patients injectés ont présenté une réponse immune (Meredith et coll, 1992). Comme le montrait de façon très intéressante l'expérience de réinjections de deux des patients immunisés, les demi-vies dans le corps entier étaient nettement réduites (70%) en présence d'HAHA.

Par ailleurs, la ciclosporine A à faibles doses, administrée pendant quelques semaines après l'injection de l'AcM a été testée avec succès pour prévenir le développement d'HAMA avec peu ou pas de toxicité (Weiden et coll., 1994). Dans les études cliniques chez des patientes atteintes de cancer du sein utilisant ^{131}I ou ^{90}Y -DOTA-peptide-(Ch)L6 et la ciclosporine A à titre prophylactique, toutes sont restées HAMA négatives après 6 administrations du radiopharmaceutique (Khazaeli et coll., 1991). Ces résultats contrastent avec le 100% de développement d'HAMA observés après l'administration d'une activité importante de RIT (Ch)L6 sans ciclosporine A et laisse à penser que la ciclosporine A facilite la RIT fractionnée. La clairance de l'AcM dicte probablement la durée de la prophylaxie par ciclosporine A requise pour prévenir les HAMAs (Richmann et coll., 1999).

III.4.4. Voie d'administration

Un autre paramètre largement étudié concerne la voie d'administration de l'immunoconjugué. L'injection systémique majore le risque d'irradiation des organes sains bien irrigués et expose l'immunoconjugué aux Ag circulants et aux molécules capables de fixer une immunoglobuline. Comme pour la chimiothérapie, la RIT intracavitaire a pour objectif d'améliorer le ciblage tumoral en limitant la toxicité pour les organes sains. Les AcM peuvent être aussi administrés localement, en régional ou en intra-tumoral, pour augmenter l'irradiation tumorale (Sharkey et coll., 2008). En effet, ces options ont donné cliniquement des résultats encourageants, particulièrement quand l'AcM était injecté dans des réservoirs chirurgicaux pour le traitement complémentaire

de tumeurs cérébrales ou directement dans la cavité abdominale pour le traitement du cancer ovarien (Riva et coll., 2000 et Meredith et coll., 2001).

III.5. RIT et tumeurs solides

Les questions qui se posent aujourd'hui ne concernent donc plus la faisabilité pratique et clinique de la RIT, mais plutôt son extension à d'autres pathologies que celles des lymphomes (Bellet et coll., 2005 ; Chatal et coll., 2009 ; Lin et coll., 2010). En effet, l'efficacité de la RIT reste à confirmer dans les tumeurs solides. Ces dernières années, des progrès ont cependant été réalisés et des résultats prometteurs ont été rapportés dans certaines pathologies (cancer médullaire de la thyroïde, carcinome prostatique), avec les systèmes de préciblage (Kraeber-Bodéré 2003 ; Salaün 2008 ; Sharkey et coll., 2011) ou l'utilisation de la RIT en consolidation ou en injection loco-régionale.

A propos du cancer médullaire de la thyroïde, une étude rétrospective a été menée pour comparer la survie de 29 patients ayant reçu une RIT avec pré-ciblage avec celle de 39 patients contemporains non traités pour lesquels des données ont été recueillies par le Groupe français des tumeurs endocrines (GTE) (Chatal et coll., 2006). La survie globale était significativement plus longue chez les patients traités à risque élevé (temps de doublement de la calcitonine <2 ans) que chez les patients à haut risque non traités (médiane de survie globale, 110 mois contre 61; $P < 0,030$). Quarante-sept pour cent des patients, définis comme des répondeurs biologiques, ont eu une survie significativement plus longue que les non-répondeurs (médiane de survie globale, 159 contre 109 mois; $P < 0,035$) ou les patients non traités (médiane de survie globale, 159 contre 61 mois; $P < 0,010$). Les patients traités qui présentaient une atteinte de la moelle osseuse et/ou de l'os ont eu une survie plus longue que les patients non métastatiques (survie globale à 10 ans de 83% contre 14%; $P < 0,023$). La toxicité a été principalement hématologique et liée à l'atteinte osseuse. Cette dernière a été montrée, par notre groupe, comme plus fréquente que précédemment décrite chez les patients atteints de cancer médullaire de la thyroïde (Mirallié et coll. 2005).

Dans le cancer de la prostate (CP), comme jusqu'à 40% des patients développent des métastases malgré un traitement local (Jemal et coll., 2010) et qu'au stade métastatique, le CP est incurable : de nouvelles thérapies moléculaires ciblées

apparaissent nécessaires. Le CP est une indication idéale pour les thérapies utilisant des anticorps monoclonaux (AcM) en raison de son mode de dissémination (moelle osseuse et ganglions lymphatiques bien vascularisés) et les petites masses tumorales facilitant l'accessibilité aux antigènes. Il est, de plus, radiosensible, ce qui est idéal pour un traitement par RIT avec des AcM radio-marqués et l'on dispose d'un bon marqueur d'évaluation clinique de l'efficacité avec le PSA. L'antigène membranaire spécifique de la prostate (PSMA) est un marqueur de la surface cellulaire des CP, non sécrété et considéré comme une cible idéale pour la RIT (Tagawa et coll., 2010). C'est une protéine membranaire de type II exprimée intensément et de façon presque universelle sur les cellules épithéliales de la prostate (Bostwick et coll., 1998). Son expression augmente progressivement dans les cancers de haut grade, les formes métastatiques et hormono-réfractaires (Sweat et coll., 1998). L'AcM J591 est une IgG monoclonale humanisée qui se lie à la partie externe du PSMA et est rapidement internalisée (Liu et coll., 1997). Des essais cliniques de phase I évaluant le J591 marqué à l'yttrium-90 (90Y) ou au lutétium-177 (177Lu) ont été réalisées chez des patients atteints de CP métastatiques résistants à la castration (Milowsky et coll., 2004 ; Bander et coll., 2005). La dose maximale tolérée (DMT), la dosimétrie, la pharmacocinétique, et le taux d'immunisation par les AcM radio-marqués ont été définis et un effet anti-tumoral a été observé. Une étude de phase II de RIT a été ensuite réalisée avec le 177Lu-J591, confirmant la tolérance, le ciblage tumoral et l'efficacité (Tagawa et coll., 2008). La myélo-suppression était la toxicité la plus importante ; le ciblage des sites métastatiques connus était obtenu dans 94% des cas. En résumé, les trois essais ont montré que le J591 radiomarqué était bien toléré et non immunogène. Le J591 radiomarqué cible effectivement les métastases du CP avec une sensibilité et une spécificité élevées et induit une diminution du PSA. Les deux radiomarquages du J591 au 177Lu ou au 90Y ont entraîné une myélosuppression avec peu de toxicité non hématologique. Les patients atteints de cancer de prostate résistant à la castration ont toléré la RIT anti-PSMA soit avant soit après la chimiothérapie, et aucun effet à long terme sur la fonction de moelle osseuse n'ont été observés.

L'indication privilégiée de la RIT est la maladie résiduelle microscopique. Le ciblage de la maladie résiduelle peut être obtenu par un traitement délivré très précocement lors de

la récurrence (devant une anomalie biologique conventionnelle ou moléculaire) ou par l'administration d'un traitement de consolidation après une phase thérapeutique initiale d'induction. L'utilisation de la RIT en consolidation apparaît, par exemple, très encourageante dans le lymphome (Press et coll., 2003 ; Leonard et coll., 2005 ; Morschhauser et coll., 2008). Press et al. Rapportait, par exemple, dans une population de lymphomes folliculaires non traités, un taux de réponse complète (RC) de 27% après une chimiothérapie usuelle de type CHOP et de 54% lorsque la chimiothérapie était consolidée par une cure de Bexxar® et cela au prix d'une toxicité acceptable (Press et coll., 2003). La RIT en consolidation apparaît également prometteuse pour les tumeurs solides. Ainsi, des résultats favorables ont été rapportés pour les carcinomes colorectaux métastatiques avec une RIT anti-ACE de consolidation après chirurgie (Liersch et coll., 2005). Le taux de survie à 5 ans était de 51,3% dans cette série de 23 patients recevant du 131I-labetuzumab (AcM anti-ACE) après résection de métastases hépatiques avec une médiane de survie globale de 31 mois sans la consolidation avec la RIT et de 58 mois pour le groupe avec RIT. Les taux de survie (analyses de Kaplan-Meier) ont été estimés à 94,7% à un an, 78,9% à 2 ans, 68,4% à 3 ans et 42,1% à 5 ans avec la RIT et à 94,7%, 68,4%, 36,8% et 15,8% respectivement pour le groupe contrôle (Liersch et coll., 2007).

L'efficacité des radionucléides émetteurs bêta- est théoriquement limitée pour détruire les cellules isolées, le dépôt d'énergie des particules se faisant essentiellement en dehors de la cellule. Les émetteurs de particules alpha sont plus adaptés pour la maladie résiduelle (Mulford et coll., 2005 ; Zalutsky et coll., 2000 ; Allen et coll., 2004). Le TEL des particules alpha émises par l'astate 211 est de 97 keV/ μm , une valeur 400 fois plus élevée que l'énergie bêta- émise par l'⁹⁰Y par unité de longueur. De nombreuses études avec des lignées cellulaires humaines de cancer ont confirmé la cytotoxicité importante des cibles des particules- α , la réduction de la survie des cellules à 37% (D_{01} , le paramètre classique pour évaluer la mort cellulaire) atteint au bout de seulement 1 à 10 frappes de particules- α par cellule (Akabani et coll., 2006). En outre, la capacité de tuer les cellules cancéreuses avec un fort TEL n'est pas compromise par l'hypoxie ou la situation de la cellule dans le cycle cellulaire ce qui augmente l'attractivité de ces radioéléments pour la RIT. Le J591 marqué au bismuth-213 a démontré une

efficacité en préclinique. Toutefois, la demi-vie de 46 minutes du ^{213}Bi n'est pas compatible avec un usage clinique (Couturier et coll., 2005). Parmi les radionucléides émetteurs alpha utilisés en médecine, l'astate-211 est considéré comme le plus approprié pour l'alpha-RIT avec une demi-vie de 7 heures. Sa demi-vie est assez longue pour les paramètres pharmacocinétiques des AcM intacts ou des fragments administrés par voie intraveineuse. Plus de 99% de l'énergie du rayonnement de ^{211}At provient des particules- α (Larsen et coll., 1999). L'un des plus importants obstacles à l'application clinique de ^{211}At est l'offre limitée de ce radionucléide. Sur la base d'études précliniques, Zalutsky et al. a reçu l'approbation de la FDA pour effectuer une étude de phase I pour l'évaluation de la pharmacocinétique et de la toxicité de l'AcM 81C6 chimérique marqué à ^{211}At chez des patients atteints de tumeurs récurrentes du cerveau (Zalutsky et coll., 2002). Il a été trouvé particulièrement encourageant le fait que 2 de ces patients aient survécu pendant 150 et 151 semaines après la RIT, ce qui est bien supérieure à la survie obtenue avec les traitements conventionnels (25-30 semaines). Une autre étude de phase I avec administration par voie intraperitoneale de ^{211}At -MX-35 F(ab')₂ chez des patientes atteintes de cancer de l'ovaire a été menée (Andersson et coll., 2009). L'étude a indiqué que l'administration intrapéritonéale de ^{211}At -MX-35F(ab')₂, permet d'atteindre des doses absorbées thérapeutiques dans des tumeurs microscopiques sans toxicité significative.

Les résultats de l'utilisation en consolidation dans le carcinome colo-rectal ont été présentés dans un paragraphe précédent.

Pour les tumeurs cérébrales, la RIT a été évaluée en intra-cavitaire, le plus souvent pour éradiquer une maladie localement avancée après l'exérèse chirurgicale de la masse (Zalutsky et coll., 2005). Le réel avantage de cette approche, est que les AcM radiomarqués placés directement dans la cavité chirurgicale restent sur site, épargnant ainsi les autres organes de l'exposition aux radiations. Les études cliniques qui ont utilisé l'AcM anti-tenascin marqué à l'iode 131 pour le traitement du glioblastome multiforme, ont obtenu des résultats encourageants avec une médiane de survie similaire à celle obtenue avec la radiothérapie ou la chirurgie stéréotaxique mais avec moins de radionécrose (McLendon et coll., 2007). Une relation a été mise en évidence entre la dose d'irradiation absorbée au niveau du pourtour de la cavité cérébrale post-

chirurgicale où l'AcM a été déposé et la récurrence tumorale ou la radionécrose (Akabani et coll., 2000). D'autres données encourageantes, avec le même AcM radiomarqué injecté localement, sont rapportées chez des patients nouvellement diagnostiqués et il semble exister un renforcement de l'effet de l'exposition aux radiations sur les bords de la cavité chirurgicale en combinaison avec la radiothérapie externe et la chimiothérapie (Reardon et coll., 2008).

En conclusion, intégrer la RIT dans un traitement des tumeurs solides reste de nos jours un défi, mais il existe de nombreux développements prometteurs. La RIT est bien tolérée et la toxicité hématologique est gérée comme celle due à la chimiothérapie.

IV. IMMUNOTEP

IV.1. Concept de « médecine personnalisée »

Les progrès constants, réalisés depuis 30 ans, dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'oncogenèse, sont à l'origine de changements profonds dans la prise en charge thérapeutique des patients. Bénéficiant d'avancées technologiques majeures, la caractérisation moléculaire fine des tumeurs met en évidence leur diversité et permet de mieux comprendre la variabilité de la réponse aux agents thérapeutiques. En effet, des individus atteints d'un même type de cancer, défini selon l'organe cible, avec des caractéristiques histologiques comparables, présentent le plus souvent des cancers « biologiquement » différents auxquels les pronostics et les réponses thérapeutiques associés peuvent être extrêmement variables. La pharmacologie moléculaire des tissus cibles a permis le développement de traitements plus spécifiques, dénommés thérapies ciblées, utilisant des agents issus de la synthèse organique et ou des anticorps monoclonaux. En pratique médicale, l'identification de la cible au niveau de la tumeur du patient devient donc un pré-requis avant toute décision de traitement, conduisant au concept de médecine personnalisée. Le but de celle-ci est de donner la bonne molécule, à la bonne dose, au bon patient, et au bon moment, et constitue actuellement l'un des enjeux majeurs en cancérologie (Mitsiades et coll., 2011 ; Gonzalez-Angulo et coll., 2010 ; Willmann et coll., 2008). Cette

conception entend exploiter les informations moléculaires pour orienter la prise en charge.

Le diagnostic moléculaire va jouer un rôle important dans la médecine personnalisée. En effet, la thérapie et le diagnostic seront intégrés dans le cadre d'une approche dite « théranostique ». Si ce diagnostic moléculaire peut être réalisé à partir d'informations de pharmacogénétique ou de pharmacogénomique, l'imagerie de médecine nucléaire permet elle, de caractériser le phénotype tumoral et de détecter des bio-marqueurs en utilisant des vecteurs radio-marqués ciblant spécifiquement les processus biologiques d'intérêt *in vivo*.

IV.2. Rôle émergent de l'immunoTEP

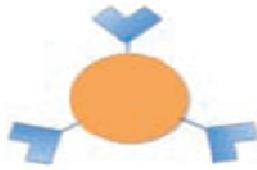
L'analyse de biopsies *ex vivo* par différentes méthodes biochimiques et immunohistochimiques est la manière la plus courante de confirmer la présence de « cibles tumorales ». Malheureusement, toutes les lésions ne peuvent pas être biopsiées et la lésion biopsiée ne représente pas forcément le phénotype de l'ensemble des lésions. Les techniques d'imagerie non invasives *in vivo* peuvent permettre une détection des différentes lésions mais aussi une évaluation thérapeutique (van Dongen et coll., 2007 ; Pantaleo et coll., 2009 ; Boerman et coll. 2011). Pendant les vingt dernières années, les AcM et/ou fragments ont été radiomarqués avec des radioéléments à émission monophotonique pour réaliser des TEMP comme le satumomab pendetide (OncoScint ;Cytogen Corp) ciblant le TAG-72 pour le cancer colorectal et le carcinoïde ovarien ou le capromab pendetide (ProstaScint ; EUSAPharma) pour le cancer de la prostate par exemple. Toutefois, l'exactitude diagnostique de ces immunoscintigraphies restait limitée ; de plus l'arrivée en clinique de la TEP au FDG a rendu ces imageries obsolètes, et ce malgré l'absence de spécificité du FDG. Chez la plupart des patients, la sensibilité et la spécificité de la TEP FDG étaient supérieures à l'immunoscintigraphie. De plus, l'analyse quantitative des images TEP FDG a permis d'obtenir une information valable sur le métabolisme tumoral et la réponse thérapeutique.

En raison des progrès technologiques dans la production des anticorps réalisés ces dernières années, et de la disponibilité de radioéléments émetteurs de positons à durée

de vie variable, un nouvel intérêt se dégage dans la littérature scientifique pour l'imagerie avec des AcM radiomarqués : l'immunoTEP (Marik et coll., 2011 ; McCabe et coll. 2010). Cette approche peut être envisagée avec des IgG intactes à distribution lente avec des radioéléments à demi-vie relativement longue, ou avec des vecteurs de plus petites taille (fragments, diabodies, minibodies, affibodies) avec des radioéléments à demi-vie relativement courte permettant d'obtenir une imagerie rapide avec un contraste important (Olafsen et coll., 2010) (tableau 4). Le cahier des charges de l'élaboration d'un traceur pour une imagerie en immunoTEP doit combiner différents facteurs (figure 12).

Radioélément	β^+ (%)	Demi-vie	E_{β^+} Max(keV)	Résolution intrinsèque(mm)	Source
¹⁸ F	96.7	110 min	633.5	0.7	Cyclotron
⁶⁴ Cu	17.4	12.7 h	653.1	0.7	Cyclotron
⁶⁸ Ga	89.1	68 min	1899.1	2.4	Cyclotron
⁸⁹ Zr	22.7	3.3 d	901.5	1.0	Cyclotron
¹²⁴ I	22.8	4.2 d	2137.6-1534.9	2.3	Cyclotron

Tableau 4 : Radioéléments utilisables en TEP avec des AcM et des fragments
(Marik et coll., 2011)



Imagerie de ciblage

- Localisation des cellules cibles
- Niveau d'expression dans la tumeur et les tissus normaux
- Taux d'internalisation



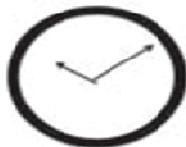
Molécule biologique de ciblage

- Propriétés pharmacocinétiques
- Voie d'élimination
- Chimie de marquage



Radioélément

- Demi-vie physique
- $E_{\beta+}$
- Emissions autres (β^- , γ)
- Coût et disponibilité



Autres facteurs

- Localisation anatomique de la tumeur
- Délai désiré entre l'administration et la réalisation des images

Figure 12 : Facteurs à prendre en compte pour élaborer un traceur d'immunoTEP

(McCabe et coll., 2010)

Les applications potentielles de l'immunoTEP peuvent être divisées en deux sous-groupes. Tout d'abord, l'imagerie peut répondre aux questions basiques de la thérapie ciblée : est-ce que la cible est présente et où ? Le deuxième groupe de questions est plus complexe : la cible est-elle accessible in vivo? La dose est-elle optimisée? Y-a-t-il une réponse au traitement ?

IV.3. Applications de l'immunoTEP

L'immunoTEP a des avantages importants par rapport à l'immunoscintigraphie comme nous l'avons déjà discuté. En effet, non seulement elle permet une meilleure résolution des images mais la concentration de l'AcM radiomarké dans les cibles tumorales peut

être déduite sur les images et est superposable aux mesures *ex vivo* effectuées dans le sang et dans les cibles tumorales (Carrasquillo et coll., 2011). Cet avantage peut être utilisé en RIT myéloablatif pour déterminer l'activité maximale qui peut être administrée sans dommage en se basant sur les doses estimées d'irradiation et les doses-limites d'organes. Il a été démontré que les doses d'irradiation de RIT avec le ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan (Zevalin ;Spectrum Pharmaceuticals) peuvent être prédites par immunoTEP avec le ⁸⁹Zr-ibritumomab tiuxetan (Perk et coll., 2006). De même, la prédiction de doses peut être appliquée à la RIT avec des AcM marqué au ¹⁷⁷Lu et au ⁹⁰Y. En revanche, quand les AcM sont internalisés, la dose d'irradiation à la moelle osseuse sera sur-estimée si l'on se base sur la dosimétrie du Zirconium 89 (Perk et coll., 2005).

L'immunoTEP peut aussi être utilisée pour quantifier l'expression et la fonction des Ag accessibles dans les cibles tumorales *in vivo* et permettre d'obtenir une information fiable pour le diagnostic, la planification thérapeutique et le suivi thérapeutique comme avec le trastuzumab dans le cancer du sein. En pratique clinique, une patiente avec un cancer du sein métastatique est éligible à un potentiel traitement par trastuzumab si la surexpression du récepteur Her2 est retrouvée en analyse immuno-histochimique sur une pièce anatomopathologique. Cette même décision pourrait être réalisée par immunoTEP car l'imagerie avec le ⁸⁹Zr-trastuzumab peut montrer le ciblage lésionnel *in vivo* et à l'échelle du corps entier (Dijkers et coll., 2010). De plus, la caractérisation phénotypique des processus tumoraux est pertinente lorsque des spectres biologiques et des comportements cliniques variables sont attendus, avec un impact sur la réponse aux traitements ou lorsque les médicaments ciblés sont combinés avec les autres modalités de traitement comme la chimiothérapie et la radiothérapie, afin d'identifier de possibles synergies et les séquences les plus favorables.

Une autre application de l'immunoTEP est son utilisation dans le développement de « médicaments-AcM ». Une TEP réalisée avec ces molécules marquées à l'iode 124 ou au ⁸⁹Zr pourraient donner des informations quantitatives en pharmacocinétique, sur leur accumulation dans les tissus ciblés et non ciblés et sur la saturation des Ag ciblés.

L'utilisation de l'immunoTEP dans ces études permettrait potentiellement d'accélérer le développement de ces médicaments et d'en réduire les coûts.

Les rapports S/B de l'imagerie utilisant les AcM peuvent être améliorés par des approches de pré-ciblage. La tumeur est préciblée avec un AcM bispécifique pour l'Ag tumoral et pour un Haptène. Après le préciblage de la tumeur, le peptide radiomarqué conjugué à l'haptène est injecté. Quelques études pré-cliniques sont répertoriées avec des peptides marqués à l'iode 124, au Gallium 68 ou au Fluor 18 (McBride et coll, 2006 ; Sharkey et coll., 2008 ; Schoffelen et coll., 2010). Ces études montrent des images avec un contraste de qualité et une meilleure sensibilité et spécificité que celles obtenues avec un marquage direct de l'anticorps ou avec le FDG.

L'immunoTEP est donc une nouvelle technologie qui permet à l'imagerie AcM du cancer de renaître de ses cendres et d'être utilisée pour la médecine personnalisée, les calculs de dose en RIT et le développement de « médicaments-AcM ».

V. IMMUNO-CIBLAGE ET CANCER DU SEIN

Dans le cancer du sein, bien que plus de 60% des patientes soient guéries par leur traitement initial, les autres patientes bénéficient de traitements palliatifs mais décèdent de leur maladie à plus ou moins long terme. La mise en évidence précoce des micro-métastases et l'amélioration des stratégies thérapeutiques semblent donc nécessaires. Des études de RIT dans le cancer du sein ont décrit différentes approches utilisant divers radioéléments, AcM et fragments, thérapies combinées pour une synergie thérapeutique. (DeNardo et coll., 2005). Le développement de thérapies ciblées froides ou radioactives conduit aussi au développement de l'immunoTEP, de nouveaux radioéléments TEP étant disponibles.

Les micro-métastases du cancer du sein ont démontré leur radiosensibilité car l'utilisation de la radiothérapie externe sur le siège de la tumorectomie pour cibler la maladie microscopique résiduelle produit le même contrôle régional à 8-10 ans (survie sans récurrence et survie globale) qu'après mastectomie (Lichter et coll., 1992). La radiosensibilité des tissus sains a empêché l'administration de doses similaires de radiothérapie externe au corps entier.

L'index thérapeutique de la RIT a été amélioré ces dernières années. Il est maintenant

possible de délivrer à la tumeur une dose d'irradiation très supérieure à celle reçue par les tissus sains (DeNardo et coll., 1999). La RIT dans les essais cliniques pour le cancer du sein peut délivrer de 2 000 à 4 000 cGy à la maladie métastatique quand un support avec un greffon de cellules autologues de la moelle osseuse est utilisé. Cela fait de la thérapie combinée avec la RIT un objectif impératif. Le plus important effet limitant la dose a été l'aplasie médullaire; les autres toxicités ayant été minimales en dehors d'administration de fortes activités. Les escalades de doses n'ont pas atteint le niveau de toxicité d'un deuxième organe. Avec un support par greffon de cellules autologues de la moelle osseuse, une dose totale d'irradiation de 11 200 cGy a été délivrée à la maladie métastatique dans le cancer du sein par 3 cycles de ^{131}I -ChL6 (150 mCi/m²). La plus forte dose d'irradiation délivrée à un organe sain (poumon) a été de 3 100 cGy ce qui n'a pas entraîné de toxicité évidente (Richman et coll., 1997).

Des études de phase I/II de RIT dans le cancer du sein ont rapporté des réponses cliniques transitoires mais pertinentes chez 30 à 60% de patientes atteintes d'une maladie avancée et déjà lourdement traitée. Les organes sains qui ont reçu la dose d'irradiation la plus élevée ont été le foie, puis le poumon et le rein; cette dose dépendait du radioélément utilisé, de l'Ag ciblé, de l'AcM ou du fragment d'AcM portant l'isotope (DeNardo et coll., 2005).

V.1. RIT du cancer du sein

Différents Ag bien caractérisés ont été ciblés pour la RIT du cancer du sein avec des résultats prometteurs démontrant l'intérêt de l'approche dans cette maladie. Les résultats restent préliminaires. Les rechutes dans le cancer du sein sont essentiellement dues à la dissémination métastatique microscopique systémique précoce qui est l'indication idéale pour la RIT avec des émetteurs bêta- d'énergie moyenne ou des émetteurs de particules alpha.

V.1.1. Ciblage de HER-2/Neu

Le trastuzumab est un AcM humanisé recombinant de la classe des IgG1 dirigé contre le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (Her2). Depuis quelques années, les indications de l'Herceptin® se sont étendues au traitement du cancer du sein métastatique, avec surexpression tumorale de Her2, en deuxième ligne, à

l'association avec le paclitaxel ou le docetaxel, en première ligne, à l'association à un inhibiteur de l'aromatase chez les patientes ménopausées et au traitement adjuvant en 1^{ere} ligne. Récemment, il a été démontré que l'Herceptin® pouvait être un vecteur de RIT avec potentiellement une faible quantité d'AcM afin de réduire les effets cardiotoxiques (Rasaneh et coll., 2009, Rasaneh et coll., 2010). L'AcM a été évalué marqué au ¹⁷⁷Lu adapté aux tumeurs de petites taille (Brouwers et coll., 2004 ; Vallabhajosula et coll., 2005). Le ¹⁷⁷Lu émet aussi des photons γ (208 keV, 11%) ce qui permet une imagerie qui est importante pour déterminer la dose délivrée aux tumeurs et aux tissus sains. Le marquage de l'Herceptin® avec le ¹⁷⁷Lu a permis une cytotoxicité 8 fois plus importante que celle constatée avec ¹¹¹In-Herceptin. La biodistribution chez les souris a montré une clairance sanguine lente et une faible concentration de la radioactivité dans l'os démontrant une stabilité du complexe du marquage *in vivo*. Enfin, les ratios tumeur/tissus sains étaient favorables (Rasaneh et coll., 2010).

La RIT anti-Her2 a été également testée avec le ²¹³Bi, émetteur de particules alpha. Song et coll. ont rapporté une étude avec un AcM murin marqué au ²¹³Bi chez des souris neu-N transgéniques exprimant « Her-2 rat » avec une dissémination spontanée hépatique et osseuse de la maladie (Song et coll., 2008). Le traitement avec la dose maximale tolérée (DMT) (120 μ Ci) a augmenté de 41 jours la médiane de survie des animaux ce qui était significativement différent du groupe contrôle mais aussi des groupes traités avec des activités moindres. La même équipe, sur le même modèle animal, a comparé les performances de l'AcM marqué avec 2 émetteurs alpha différents (²²⁵Ac et ²¹³Bi) ainsi que l'⁹⁰Y (Song et coll., 2009). Une injection unique de 400 nCi de l'AcM-²²⁵Ac éradiquait les micrométastases pulmonaires chez 67% des animaux et la survie était alors supérieure à 1 an. Pour comparaison, les médianes de survie obtenues respectivement avec l'AcM marqué au ²¹³Bi, à l'⁹⁰Y et dans le groupe contrôle étaient de 61, 50 et 41 jours. Les analyses dosimétriques ont montré que les métastases traitées avec l'²²⁵Ac-AcM recevaient une dose de 9,6 Gy, contre 2,0 Gy avec le ²¹³Bi et 2,4 Gy avec le ⁹⁰Y. Cependant, la fixation rénale apparaissait importante, suggérant de diminuer les activités injectées pour une application clinique. Néanmoins, ces données sont très encourageantes pour les 20-30% de cancers du sein

avec surexpression tumorale de Her2.

V.1.2. Ciblage de l'Antigène Carcino-Embryonnaire (ACE)

L'expression de l'ACE est très inconstante dans le cancer du sein, 12% au stade non métastatique et 35-40% des cancers du sein en phase métastatique (DeNardo et coll., 2005).

Plusieurs AcM anti-ACE ont été utilisés en phase I/II de RIT chez des patientes dans divers cancers (Goldenberg et coll., 1994). Le NP-4 (IgG1) d'origine murine, spécifique de l'ACE, a montré dans une étude de phase I/II d'escalade de doses de ¹³¹I-NP-4 chez un groupe de patientes porteuses d'adénocarcinome d'origine diverse, quelques réponses chez les patientes atteintes de cancer du sein.

Par ailleurs, l'AcM T84.66 (IgG1 de souris) a été évalué dans des essais de RIT ciblée pour le cancer du sein (Esteban et coll., 1994). Cet AcM ne présente de réaction croisée avec aucune autre molécule de la famille de l'ACE (Wong et coll., 1998). Une forme chimérique a été utilisée dans des essais de phase I/II. La DMT pour le T84.66-90Y a été de 22 mCi/m² (myélosuppression grade 3 réversible). Une injection avec une activité de 15 (3 patientes) et de 22,5 mCi/m² (3 patientes) a été administrée chez 6 patientes métastatiques avec des masses détectables, avec réinjection systématique d'un greffon de cellules autologues après la RIT. Des réponses cliniques modérées ont été observées incluant une maladie stable pendant 4 mois, une amélioration de la scintigraphie osseuse avec une réduction de 50% de la fixation des (ou du nombre ?) métastases, une réduction d'un épanchement pleural pendant 14 mois et des douleurs osseuses pendant 1 à 3 mois (Wong et coll., 1998). Ces résultats suggéraient dans le cancer du sein un effet anti-tumoral potentiel avec un support de cellules autologues.

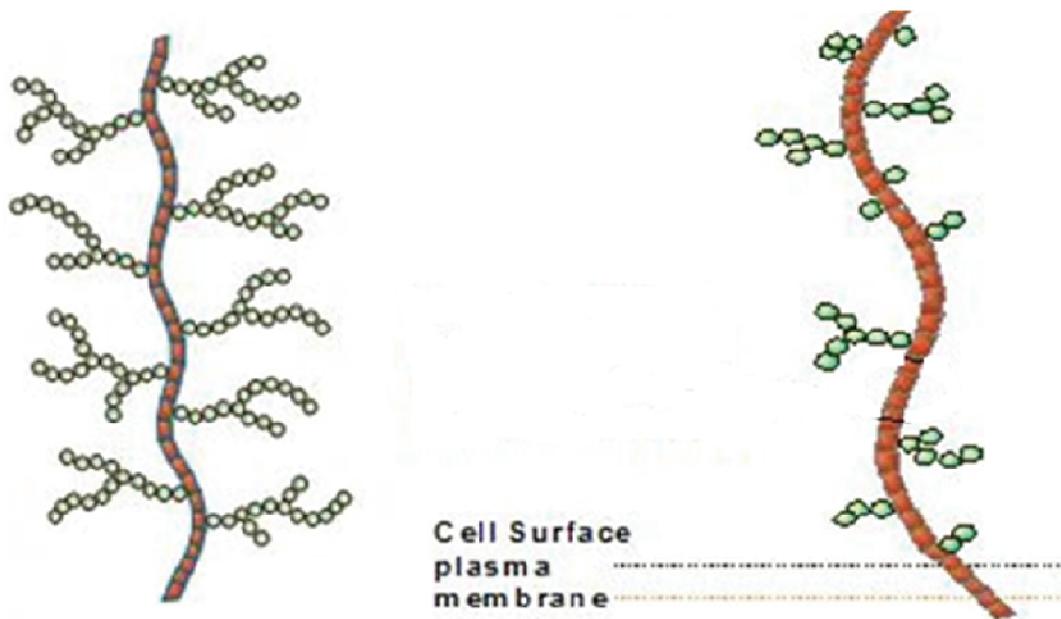
De plus, en raison de la co-expression de plusieurs Ag par les carcinomes mammaires, Crow et coll. ont rapporté l'expérience d'un usage combiné d'AcM anti-ACE (cT84.66) et anti-HER2 marqués à l'yttrium 90 chez des souris xénotransplantées d'une tumeur mammaire MCF7 (Crow et coll., 2005), exprimant peu l'ACE et HER2 ce qui reflète une situation clinique fréquente. Ils ont comparé la RIT avec l'AcM anti-ACE-90Y combinée avec une ou deux administrations de Taxol® à l'association de l'AcM anti-HER2-90Y suivi d'Herceptin® et enfin l'administration des 2 AcM radio-marqués décalée dans le temps.

L'administration d'90Y-anti-HER2 suivie d'90Y-anti-ACE était plus efficace que l'administration séparée de l'un ou de l'autre. De plus, la combinaison de la RIT et de la chimiothérapie était appropriée même si HER2 et l'ACE était faiblement exprimé, ce qui permettait d'ouvrir à un nombre plus important de candidates ces thérapies combinées.

V.1.3. Ciblage de l'antigène MUC-1

MUC1 est une glycoprotéine de grande taille exprimée au pôle apical de nombreuses cellules épithéliales (Figure 13). Elle contribue avec d'autres mucines à protéger et à assurer la fonctionnalité des épithéliums muqueux. Sa partie intracellulaire, par ses interactions avec de multiples protéines intracellulaires, est supposée participer aussi à la transduction de signaux. Dans la majorité des épithéliomas, il est fréquent d'observer une surexpression de MUC1. Dans les cellules malignes, MUC1 est exprimée de façon diffuse et surtout avec une glycosylation réduite et anarchique (Figure 13). De plus, certaines glycoprotéines MUC-1 sont libérées de la surface cellulaire et des épitopes d'antigènes sont présents dans la circulation. Une quantification de ces molécules dans le sang peut être utilisée pour suivre la masse tumorale, la récurrence ou la réponse à la thérapie (par ex. Ca 15-3) (Seregini et coll., 2004).

Les anomalies liées au processus tumoral rendent MUC1 antigénique et en font une cible très attractive pour une immunothérapie ciblée du cancer. De nombreux anticorps reconnaissent les épitopes MUC-1 cellulaires, mais pas ceux présents dans le sang et les tissus sains. Deux d'entre-eux, Normal MUC-1 mucine et MUC-1 cancer mucine, pour lesquels on a démontré un immunomarquage important sur les biopsies de cancer du sein (Howell et coll., 1995), semblent être d'excellentes cibles comme décrit dans les études d'imagerie *in vivo* (DeNardo et coll., 1997).



Normal MUC-1 mucine

MUC-1 cancer mucine

Figure 13 : Aspect de la glycoprotéine MUC-1 pour une cellule normale et une cellule maligne (d'après DeNardo et coll., 2005)

Les études d'immunomarquage sur des biopsies de cancer du sein métastatique ont montré une importante réaction de l'anticorps BrE-3 ou de sa forme humanisée (hBrE-3) avec plus de 75% des cellules dans plus de 95% des cancers du sein (Howell et coll., 1995). Après l'injection de ^{90}Y -MX-DTPA-BrE-3 (6,25 à 9,25 mCi/m²) chez 6 patientes métastatiques, il a été décrit chez 3 d'entre-elles une réponse objective pendant 3 à 8 semaines (DeNardo et coll., 1997), malgré des activités injectées modestes. La thérapie était bien tolérée. Ces données suggèrent que des activités plus fortes et/ou plusieurs injections répétées pourraient augmenter l'efficacité. La dose limitante toxique étant hématologique, un essai de phase I étudiant l'administration unique d'une activité myélo-ablative de ^{90}Y -BrE-3 avec une autogreffe de cellules souches a été initié. Neuf

patientes, avec une maladie déjà lourdement traitée, ont été incluses. Toutes présentaient à l'immunohistochimie une positivité tumorale à BrE-3. Deux paliers d'activité ont été délivrés (15 et 20 mCi/m²) associés à 5 mCi d'¹¹¹In-BrE-3 pour une imagerie concomitante. La toxicité a été uniquement hématologique, avec 4 cas de thrombopénie de grade IV nécessitant une transfusion plaquettaire et 2 neutropénies de grade IV spontanément résolutive en 3-9 jours. Les nadirs étaient atteints environ 25 jours après le traitement. Une réponse partielle objective a été décrite pour 4/9 (45%) des patientes (Schrier et coll., 1995). Comme très rapidement une immunisation HAMA a été observée chez la plupart des patientes, un anticorps humanisé BrE-3 a été développé.

Une étude clinique de phase I, chez des patientes métastatiques avec des masses détectables, a été réalisée avec l'AcM humanisé (IgG1) ⁹⁰Y-MX-DTPA huBrE-3. La dosimétrie à l'⁹⁰Y calculée à partir des données obtenues avec l'imagerie de l'¹¹¹In-MX-DTPA huBrE-3, a montré une dose d'irradiation tumorale de 70±31 cGy/mCi et une dose hépatique de 21±12 cGy/mCi (Cagnoni et coll., 1998). Neuf patientes ont reçu une administration unique d'⁹⁰Y-MX-DTPA huBrE-3 de 10, 20 et 33 mCi/m², suivie d'une réinjection systématique d'un greffon de cellules souches 14 jours après la RIT. Il n'a pas été noté de toxicité hématologique ou infectieuse bien que dans 7/9 cas la transplantation de cellules souches n'ait pas fonctionné ; 2 réponses partielles et une stabilité de la maladie ont été observées.

Par ailleurs, un AcM anti-MUC-1 17OH.82 (m170) a été développé, 90% des cancers du sein présentant à l'immunohistochimie une positivité avec m170 (Howell et coll., 1995). Une étude clinique a évalué l'⁹⁰Y-DOTA-peptide-m170. Des doses moyennes d'irradiation de 2,2 cGy/mCi pour le corps entier, 17,4 pour le foie, 6,3 pour les poumons, 8,1 pour les reins, 3,3 pour la moelle osseuse et 81,1 pour la tumeur ont été calculées. Quatre patientes ont reçues des activités thérapeutiques de 37 à 57 mCi : une réponse partielle, une réponse mineure et une stabilisation ont été observées (Figure 14). L'utilisation d'un greffon de cellules souches systématique a permis d'éviter une myelosuppression prolongée (DeNardo et coll., 1999).

L'amélioration du marquage de cet AcM a été réalisée par l'utilisation d'un nouveau chélateur dans une étude évaluant les immunoconjugués $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}$ --DOTA-peptide-m170) (Richman et coll., 1999 ; Richman et coll., 2005 ; DeNardo et coll., 2002). Le rapport de dose tumeur/foie était augmenté de 30%, laissant envisager des administrations de fortes activités avec un support de cellules souches.

Enfin, l'équipe de Peterson et coll. a montré sur diverses lignées cellulaires de cancer du sein humain greffées à des souris BALB/c-nu/nu que l'administration répétée de RIT (4 injections) avec un AcM anti MUC-1 (Mc5) marqué à l'iode ^{131}I n'induisait pas de sélection des cellules tumorales antigène-négatives (Peterson et coll., 1997). Aucune réduction de la cible antigénique n'était constatée sur les repousses tumorales après chaque injection de RIT. La RIT fractionnée et répétée, qui semble incontournable pour obtenir une réponse tumorale, semble donc possible. Récemment, une étude a évalué un nouvel AcM anti MUC-1 (PR81) marqué à l'iode ^{131}I sur une lignée de cancer du sein humain (MCF-7) greffée à des souris BALB/c nudes (Mohammadnejad et coll., 2010). ^{131}I -PR81 a inhibé la croissance de 80% des cellules de la lignée cellulaire *in vitro* alors que plus de 60% de l'AcM marqué a été internalisé à 24h. La biodistribution à 4, 24 et 48h n'a pas montré d'accumulation importante dans les organes vitaux. Pour pallier aux inconvénients dus à l'internalisation de l'AcM et son marquage à l'iode ^{131}I , les auteurs ont proposé de coupler l'AcM (PR81) à un DOTA-peptide marqué à l'iode ^{131}I ce qui permettrait de prolonger le séjour du radiopharmaceutique dans les cellules MCF7.

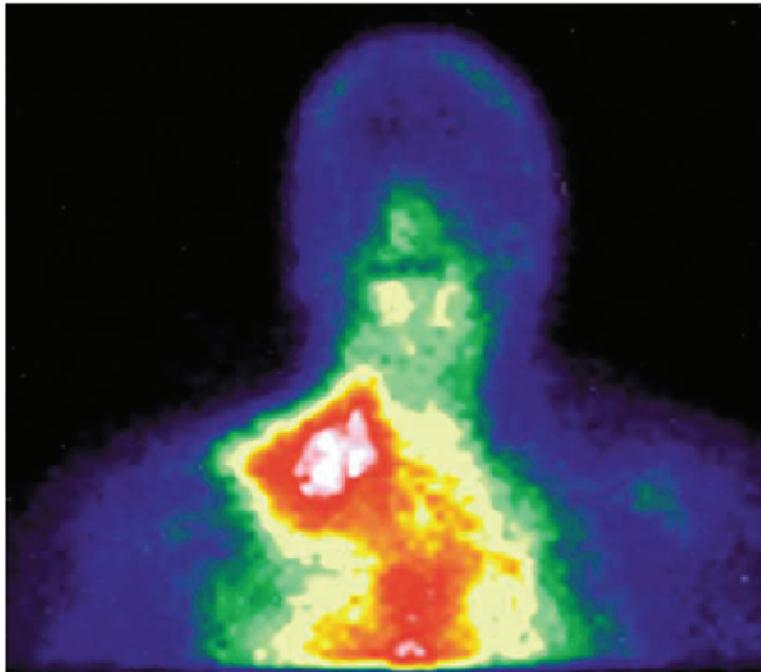


Figure 14 : Face antérieure réalisée avec 5 mCi ^{111}In —DOTA-peptide-m170. Mise en évidence d'une métastase d'un cancer du sein en supraclaviculaire droit et en médiastinal (d'après DeNardo et coll., 2005).

V.1.4. Ciblage de l'antigène L6

L'Ag de surface L6 est largement exprimé dans les cancers du poumon, du sein, du colon et de l'ovaire et est lié à un certain nombre de protéines de surface cellulaire avec une topologie membranaire semblable à celles qui sont impliquées dans la croissance cellulaire. L'antigène L6 est aussi exprimé dans l'endothélium vasculaire humain mais

peut être neutralisé par une administration d'AcM froid, ce qui permet à l'AcM L6 radiomarqué d'atteindre les cellules tumorales (Marken et coll., 1992 ; DeNardo et coll., 1994).

La version chimérique (ChL6) marqué à l'iode 131 a été administrée chez 10 patientes présentant un cancer du sein métastatique. Après l'administration d'une activité thérapeutique de ^{131}I -ChL6 (20-70 mCi/m²), la dose d'irradiation tumorale a été 5 à 30 fois plus forte que celle délivrée au corps entier. Le même AcM n'a pas montré d'efficacité avec sa forme froide. La toxicité hématologique a été peu importante. Six patientes ont présenté une réponse tumorale mesurable (DeNardo et coll., 1997). Trois patientes supplémentaires ont été incluses et ont reçu 150 mCi/ m² avec une prévention de la myélotoxicité par un greffon de cellules souches. La toxicité hématologique a été modeste et aucune toxicité non hématologique n'a été observée. Deux patientes n'ont reçu qu'un cycle de RIT du fait de l'apparition de HAMA. En revanche, la troisième a reçu 3 cycles avec une prévention des HAMA par cyclosporine A. Elle a reçu une dose d'irradiation cumulée au niveau des poumons et de la tumeur de 3 100 et 11 200 cGy respectivement. Cette patiente a présenté, pendant 9 mois, une réduction significative des douleurs osseuses, une diminution des marqueurs tumoraux et une réponse tumorale.

Du fait de l'expression au niveau de l'endothélium vasculaire de l'Ag L6, il était nécessaire d'administrer une dose de charge d'AcM L6 ou de ChL6 froid avant la RIT. Après la dose de charge, on a constaté chez les patientes, une activation immédiate du complément associée à une augmentation de la perméabilité vasculaire, à une fixation accrue du ^{131}I -ChL6 au niveau tumoral et à une augmentation du taux d'interleukin 2 (IL2) dans le sang. La réponse initiale IL2 était corrélée avec la réponse globale des patientes à la RIT (DeNardo et coll., 1994).

Enfin la même équipe a étudié chez l'animal le même AcM marqué à l'⁹⁰Y, montrant un index thérapeutique suffisant pour obtenir des réponses tumorales, sans décès toxique. La RIT avec l'⁹⁰Y-ChL6 semblait chez la souris greffée avec une lignée cellulaire humaine de cancer du sein (HBT 3477) stimuler la signalisation pro-apoptotique (DeNardo et coll., 1995).

V.1.5. Ciblage de l'antigène TAG-72

Le carbohydrate Ag CA 72-4, aussi appelé Tumor Associated Glycoprotein ou TAG-72, est reconnu par l'AcM B72-3, obtenu à partir d'une métastase hépatique de cancer du sein. Le CA 72-4 est une glycoprotéine de masse relativement élevée, supérieure à 10^6 daltons, présente *in situ* dans de nombreux adénocarcinomes incluant le colon, le sein, l'estomac, l'ovaire, l'endomètre et les cancers du poumon non à petites cellules.

Un AcM murin radiomarké (TAG-72.3 CC49) (IgG1) avec du ^{177}Lu a démontré une bonne fixation tumorale chez l'animal, avec, à des doses inférieures à DL_{50} de 400-500 μCi , une régression complète des tumeurs (Schlom et coll., 1991). Enfin, des études d'imagerie avec l' ^{131}I -B72-3 ont montré une augmentation de la fixation tumorale après un traitement à l'alpha-interféron chez une patiente sur 15 atteinte d'un cancer du sein métastatique (Murray et coll., 1995).

V.1.6. Ciblage de l'antigène Le^y (Lewis)

L'antigène Lewis (y) (Le^y) ou CD174, est un membre de la famille du groupe sanguin lié aux oligosaccharides difucosylés qui est fortement exprimé (60-90%) dans les cancers épithéliaux comme le sein, le colon, l'estomac et le poumon. Durant la formation cancéreuse, l'expression des antigènes de Lewis est fortement perturbée mais de manière cancer-dépendant. L'expression du Le^y augmente fortement dans presque tous les types de carcinomes à l'exception des cancers du pancréas et de l'endomètre (Le Pendu et coll., 2001). Ces modifications sont dues à une perturbation de l'activité des fucosyltransférases. L'importante fréquence de l'expression tumorale de l'Ag Le^y, ainsi que sa densité à la surface des cellules tumorales et sa relative homogénéité d'expression en ont fait une cible de choix pour la RIT.

L'AcM humanisé hu3S193 (anti Lewis^y) couplé à différents radioéléments a été étudié sur une lignée cellulaire de cancer du sein humain (MCF-7) greffée sur des souris BALB/c nude. Clarke et coll. ont montré, après radio marquage de l'AcM hu3S193 avec trois isotopes différents (^{125}I , ^{111}In et ^{90}Y), qu'un radioélément métallique semblait être le plus adapté pour une fixation et une rétention tumorale optimale (Clarke et coll., 2000A). La même équipe a poursuivi l'étude de cet AcM avec l' ^{131}I -hu3S193 qui a montré un potentiel thérapeutique, seul ou combiné au paclitaxel puisqu'une synergie

entre la RIT et la chimiothérapie a été démontrée (Clarke et coll., 2000B).

En 2007, une autre équipe a proposé une étude de biodistribution et d'efficacité thérapeutique du ^{90}Y -hu3S193 combiné à une chimiothérapie par paclitaxel (Kelly et coll., 2006). La biodistribution a montré un excellent ciblage tumoral avec une fixation limitée dans les tissus sains. Un effet thérapeutique a été démontré en RIT seule chez tous les animaux traités avec 1,85-3,7 MBq d' ^{90}Y -hu3S193 (troisième et quatrième paliers). Le fait d'administrer 24 heures après la RIT le paclitaxel a permis d'obtenir une régression tumorale chez les animaux ayant reçu cette fois-ci seulement le premier palier de RIT (0,46 MBq).

La même équipe a étudié cet AcM marqué au ^{213}Bi , (Kelly et coll., 2007). L'AcM hu-3S193 étant internalisé, il s'adapte d'autant mieux à l' ^{90}Y ou aux particules α . Le ^{213}Bi -hu3S193 a conduit à un ralentissement de la croissance tumorale significative et son efficacité a été augmentée par l'administration de paclitaxel jusqu'à obtenir des réponses complètes.

Récemment, la même équipe a étudié une forme (scFv) du hu-3S193 marqué à l' ^{111}In , exploitant les possibilités de pénétration tumorale et de clairance sanguine de ces petites molécules par rapport aux IgG totales (Kelly et coll., 2008). Ils ont constaté une stabilité *in vitro* limitée et une importante localisation du radiopharmaceutique dans les reins ce qui limiterait son utilisation pour la RIT et une phase d'optimisation semblait encore nécessaire.

V.2. Imagerie phénotypique et immunoTEP du cancer du sein

Le cancer du sein, exprimant le plus souvent des récepteurs et des antigènes bien caractérisés, représente une indication intéressante pour l'imagerie phénotypique, d'autant que des traitements innovants potentiellement efficaces se développent. Le FES, fluoro-oestradiol, actuellement en développement clinique permet de détecter les récepteurs hormonaux et de prédire l'efficacité thérapeutique. Linden *et al.* montraient en 2006 que la TEP au FES prédisait la réponse à un traitement hormonal de rattrapage chez des 47 patientes atteintes de cancer du sein précédemment lourdement traitées (Linden et coll., 2006). La fixation du FES était significativement corrélée à la réponse à l'hormonothérapie : aucune des 15 patientes avec une SUV initiale $< 1,5$ ne répondait,

alors qu'une réponse était observée chez 11 des 32 patientes (34%) avec un SUV > 1.5 (P < 0,01). Dans le sous-groupe de patientes ne présentant pas de surexpression de Her2, 11 des 24 patientes (46%) avec SUV > 1,5 étaient répondeuses. Une étude plus récente montrait que la TEP au FES détectait des variations pharmacodynamiques et l'efficacité du blocage entre les différentes formes d'hormonothérapie chez des patientes atteintes de cancer du sein métastatiques (Dehdashti et coll., 2009). Plusieurs équipes ont également évalué des approches d'immuno-TEP avec différents anticorps et radioéléments pour l'imagerie de Her2. Des minibodies et des scFv-Fc marqués ^{64}Cu ont été comparés dans des modèles animaux de carcinomes mammaires (Schuhmacher et coll., 2001 ; Dijkers et coll., 2009). Des études animales ont également étudié le trastuzumab marqué au ^{89}Zr (Baum et coll., 2010). Le marquage a été validé avec une bonne pureté radiochimique et activité spécifique. Les études de biodistribution montraient une fixation élevée de l'anticorps ^{89}Zr -trastuzumab dans les tumeurs Her2 positives (33,4 +/- 7,6 de l'activité injectée par gramme de tissu à 6 jours). En clinique, l'équipe de Baum a évalué le ciblage de Her2 avec de petites molécules appelées « Affibody » marquées au Gallium 68 avec du DOTA (ABY-002) (Kaplan et coll., 2008). L'administration était bien tolérée; la cinétique très rapide. Les auteurs concluaient que ABY-002 avait le potentiel pour localiser des métastases *in vivo*, tout en apportant des informations complémentaires par rapport à l'imagerie conventionnelle, permettant de déterminer le statut Her2 de façon non invasive sans biopsie.

Les tumeurs triple-négatives, au pronostic péjoratif, constituent un challenge diagnostique et thérapeutique important. Le récepteur de l'IGF-1 est une nouvelle cible pour le traitement de ces tumeurs avec des anticorps anti-IGF-1R. Heskamp *et al.* ont montré récemment que l'anticorps anti-IGF-1R R1507 marqué au ^{89}Zr était un traceur innovant pour déterminer de façon non invasive l'expression *in vivo* de IGF-1R dans des cancers mammaires, pouvant dans le futur permettre de sélectionner les patientes pour une thérapie ciblée adaptée (Heskamp et coll., 2010). Le syndécan-1 est une autre cible intéressante pour les tumeurs mammaires triple-négatives. Nous avons montré la faisabilité de l'immuno-TEP avec l'anticorps anti-syndécan-1 marqué à l'iode 124 dans une étude récente menée dans un modèle de xénogreffe d'une lignée triple-négative chez la souris (Rousseau et coll., 2011).

V.3. Une nouvelle cible : le syndécan-1

V.3.1. Généralités

Les protéoglycanes (PGs) sont des macromolécules complexes qui sont retrouvés dans la plupart des tissus animaux et sont classés en fonction de leur localisation cellulaire. Ainsi il existe les PGs intracellulaires et les formes membranaires (Melchior A., 2007 ; Bui C., 2009). Les PGs font l'objet d'un intérêt grandissant car ils sont dotés d'une position stratégique au sein des matrices extracellulaires (MEC) ou à la surface des cellules et ils jouent un rôle essentiel dans l'organisation des tissus conjonctifs en interagissant avec d'autres constituants matriciels. Ils régissent également la biodisponibilité de nombreux médiateurs solubles régulant ainsi leur activité biologique. Ces molécules présentent donc un réel intérêt thérapeutique car ce sont des macromolécules multi-facettes pouvant être considérées à la fois comme des cibles pharmacologiques et/ou comme de nouvelles molécules thérapeutiques. Les PGs sont constitués d'un squelette peptidique ou protéine «core» sur laquelle sont fixées de façon covalente au niveau de certains résidus sérine des chaînes hétéropolysaccharidiques linéaires appelées glycosaminoglycanes (GAGs).

Nous allons nous intéresser aux PGs membranaires qui portent des chaînes héparane-sulfates (PGs à HS). Ils sont localisés au niveau de la membrane plasmique des cellules, mais peuvent également exister sous forme soluble. Ils regroupent essentiellement la superfamille des syndecans et des glypicans. Situés à la surface des cellules, ils régissent de nombreux processus biologiques tels que les interactions cellule-cellule (adhésion), cellule-matrice (migration), la prolifération cellulaire, la différenciation et sont également capables de jouer le rôle de co-récepteur membranaire (Fears et coll., 2006).

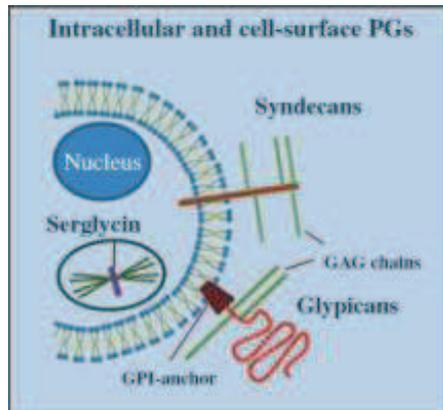


Figure 15 : Localisation et classification des PGs membranaires et intracellulaires. La Serglycine est la seule PG intracellulaire. (d'après Theocharis et coll., 2010)

V.3.1.1. La famille des syndécans

On dénombre quatre types de syndécans : le syndecan-1 (CD138), le syndecan-2 (fibroglycan), le syndecan-3 (*N*-syndécane) et le syndecan-4 (amphiglycan ou ryudocan) (Bernfield et coll., 1999). L'expression des syndécans est fortement régulée et est spécifique d'un type cellulaire mais dépend aussi de l'état d'activation et du stade de développement cellulaire. Chaque type cellulaire exprime au moins un syndecan mais la plupart des cellules expriment plusieurs isoformes. Le syndecan-1 est présent aux stades très précoces du développement embryonnaire, essentiellement sur les cellules épithéliales, mésenchymateuses, les lymphocytes pré-B, les plasmocytes et est exprimé dans divers cancers humains de l'adulte. Il est faiblement exprimé par les fibroblastes et les cellules endothéliales. Le syndecan-2 est retrouvé à la surface des fibroblastes, le foie et les cellules neuronales alors que le syndecan-3 est exprimé de façon prépondérante dans le système nerveux mais aussi dans les muscles squelettiques. Le syndecan-4 est exprimé de façon plus ubiquitaire mais souvent en quantité plus faible que ses homologues (Alexopoulou et coll., 2007 ; Schaefer L et coll., 2010).

V.3.1.2. Structure des syndecans et en particulier du syndecan-1

Les syndecans (MM = 23-43 kDa) sont formés d'un ectodomaine qui porte les chaînes GAGs, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique court. Alors que les domaines transmembranaire et cytoplasmique sont des régions très conservées (60-70% d'homologie), les ectodomaines varient d'une forme à l'autre. Entre chaque syndecan, les domaines extracellulaires ne présentent que 10 à 20% d'homologie à l'exception des sites permettant l'attachement des chaînes GAGs ou le clivage protéolytique, qui sont conservés. Les syndecans portent principalement des chaînes de HS à proximité de l'ectodomaine. La présence de ces chaînes dépend du type cellulaire (Bernfield et coll., 1999 ; Ueno et coll., 2001).

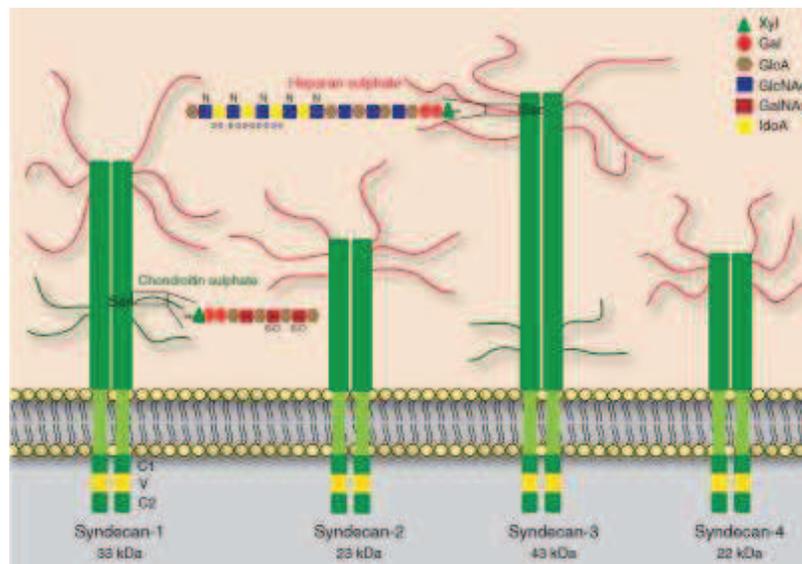


Figure 16: Schéma des 4 syndecans

Les syndecans sont des protéines transmembranaires. Leur région protéique possède principalement trois à cinq chaînes d'HS qui leur permettent de lier un grand nombre de ligands extracellulaires. Les Syndecan-1 et -3 peuvent porter à la fois des chaînes HS et chondroïne sulfate. (d'après Manon-Jensen et coll., 2010)

La fonction principale du domaine extracellulaire est de présenter la chaîne glycosaminoglycanique à la surface des cellules selon une orientation particulière à

chaque type de syndécan. Les chaînes HS vont permettre au syndécan-1 de se lier à de nombreux facteurs de croissance, comme le basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), l'Hépatocyte Growth Factor (HGF), le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) et le Platelet Derived Growth Factor (PDGF) (Bernfield et coll., 1999), des protéines de la MEC comme la fibronectine ou le collagène, des molécules participant à l'adhésion cellulaire telles que N-CAM ou P-CAM, des enzymes comme l'acétylcholinestérase, ou des facteurs de la coagulation comme le facteur tissulaire (Carey et coll., 1997). Ces chaînes permettent aussi au syndécan-1 de capter et de rapprocher ces différentes molécules de la surface cellulaire et d'en augmenter la concentration à proximité du récepteur (Marshall et coll., 2003). Le domaine cytoplasmique des syndécans est subdivisé en trois parties (deux parties conservées C1 et C2 et une région variable V). Grâce au domaine C1, les syndécans et en particulier le syndécan-1 sont impliqués dans des phénomènes de réarrangements du cytosquelette (Kinnunen et coll., 1998). Grâce au domaine C2, les syndécans peuvent fixer des protéines qui sont impliquées dans l'assemblage d'échafaudages moléculaires aboutissant au regroupement de récepteurs, à la liaison de récepteurs du cytosquelette ou encore à la formation de complexes de signalisation (Bass et coll., 2002). Le domaine V varie pour chaque syndécan suggérant son implication dans les fonctions spécifiques de chacun.

Les PGs membranaires et leurs chaînes de GAG peuvent être libérés dans la MEC ou dans la circulation sanguine par clivage endoglycosidique ou protéolytique. Les PGs subissent, comme les protéines membranaires, les processus d'endocytose et de dégradation lysosomales. Le domaine libéré conserve sa capacité à fixer des ligands par l'intermédiaire des chaînes GAGs (Endo et coll., 2003 ; Wang et coll., 2005).

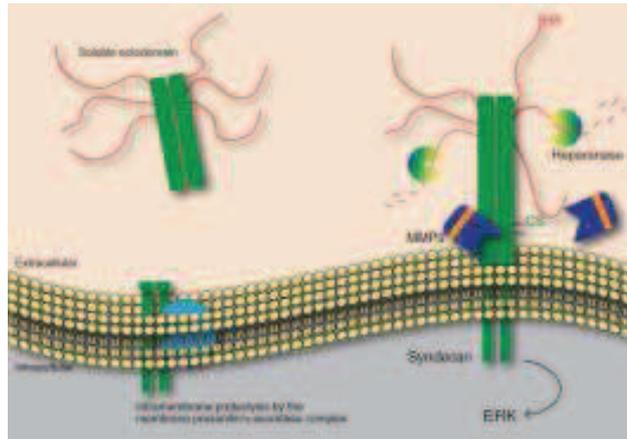


Figure 17 : Clivage d'un syndecan par une protéinase.

Le clivage est majoré si les chaînes HS sont clivées par une héparanase. (d'après Manon-Jensen et coll., 2010)

V.3.1.3. Implications du syndecan-1 dans le processus cancéreux

- Régulation de l'expression du syndecan-1

Le syndecan-1, présent dans la matrice ou à la surface des cellules, forme un complexe polysaccharidique ubiquitaire régulant de nombreux aspects de la biologie du cancer tels que la tumorigénèse, la progression tumorale et le développement de métastases (Sasisekharan et coll., 2002). L'expression du syndecan-1 à la surface cellulaire est dépendante de la régulation génique, de phénomènes d'endocytose et du clivage protéolytique de l'ectodomaine. De nombreux facteurs régulent l'expression des protéoglycanes : le $\text{TNF-}\alpha$, par exemple, diminue l'expression du syndecan-1 (Tkachenko et coll., 2005). Une régulation post-transcriptionnelle est envisagée : l'expression de syndecan-1 pouvant augmenter significativement sans modification du taux d'ARNm (Sanderson et coll., 2002 ; Asundi et coll., 1997 ; Levy et coll., 1996). Les syndecans se lient à des facteurs de croissance et les présentent à leurs récepteurs de haute affinité, activant les voies de signalisation qui favorisent la prolifération et la mobilité cellulaire. Par exemple, une activation de la voie pro-angiogénique est observée

après liaison avec le FGF-2 et le VEGF (Chang et coll., 2000 ; Gospodarowicz et coll., 1986).

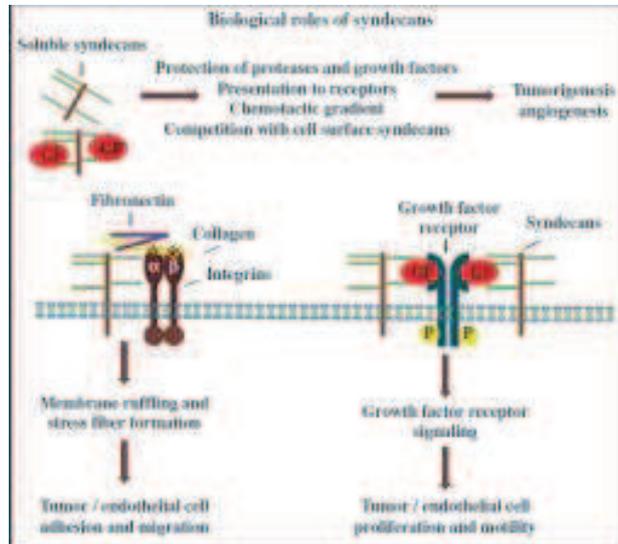


Figure 18 : rôle biologique des syndecans dans les cancers

(d'après Theocharis et coll., 2010)

Les syndecans membranaires interagissent avec les molécules de la matrice en coopération avec les intégrines, induisant la promotion de l'adhésion et de la migration cellulaire. Les syndecans se lient à des facteurs de croissance et les présentent à leurs récepteurs de haute affinité, activant les voies de signalisation qui favorisent la prolifération et la motilité cellulaire.

La forme soluble des syndecans interagit avec des facteurs de croissance en les protégeant de la dégradation et en créant un gradient chimiotactique. Cette même forme de syndecans présente les facteurs de croissance à leurs récepteurs de haute affinité activant les voies de signalisation qui favorisent la prolifération et la motilité cellulaire. La forme soluble des syndecans se lie aux molécules de la matrice, inhibant de manière compétitive les syndecans à la surface des cellules, et stimulant ainsi la migration des cellules tumorales et endothéliales.

La dégradation du syndecan-1 s'effectue par endocytose ou par clivage protéolytique de sa partie extra-cellulaire. Ce phénomène appelé « shedding » se produit à proximité de la membrane plasmique par intervention de protéases (Bernfield et coll., 1999 ; Kim et

coll., 2005). Ce phénomène est accéléré dans les cas de cancer et en réponse à des stimuli inflammatoires. Ainsi, une forme soluble du syndecan-1 peut être détectée dans le sérum des patients porteurs de tumeurs malignes. Le fragment libéré devient un récepteur soluble capable de fixer les ligands comme son précurseur membranaire (Elenius et coll., 1992 ; Charnaux et coll., 2005). Selon les ligands, les formes solubles agissent comme des activateurs ou des inhibiteurs. Par exemple, l'addition d'ectodomains de syndecan-1 à des cultures de cellules de carcinomes mammaires réduit la progression tumorale. Ces résultats suggèrent la séquestration de facteurs de croissance par la forme soluble, empêchant leur interaction avec des récepteurs membranaires. A l'inverse, cette fixation peut aussi activer ces facteurs, notamment en inhibant des protéases comme l'élastase, protégeant ainsi syndecan-1 de la dégradation (Gallagher et coll., 2000).

Une variété de facteurs de croissance (EGF, VEGF), d'enzymes pro-angiogéniques, de cytokines (IFN- γ , le TNF- α , l'IL-1 β) ou de chimiokines (SDF-1) accélèrent le phénomène de « shedding » du syndecan-1 *in vitro* (Ding et coll., 2005 ; Day et coll., 2006 ; Fitzgerald et coll., 2000 ; Fears et coll., 2006 ; Wang et coll., 2005). La forme soluble du syndecan-1 accélère la croissance tumorale *in vivo* ; *in vitro* une augmentation de l'invasion cellulaire par le biais du collagène a été observée (Yang et coll., 2002).

- *Régulation des mécanismes d'adhérence/migration*

Le syndecan-1 est un médiateur de l'adhésion cellulaire. Impliqué dans la régulation des jonctions entre les cellules épithéliales, en coopération avec les intégrines, il se lie, par l'intermédiaire de son domaine cytoplasmique, avec des molécules du cytosquelette comme l'actine F et la fascine, entraînant le « spreading » ou l'étalement cellulaire (Fears et coll., 2006 ; Beauvais et coll., 2003). Une fois le spreading achevé, l'interaction du syndecan-1 avec les molécules du cytosquelette disparaît (Carey et coll., 1997).

Il a été montré une sur-expression ou une sous-expression épithéliale du syndécan-1 en fonction des types tumoraux. Le protéoglycane est sur-exprimé dans les cancers du sein, de la prostate, les cancers ORL, et le myélome par exemple (Chen et coll., 2004) et sous-exprimé dans les cancers du poumon, de l'endomètre, de l'estomac, du pancréas et les cancers colorectaux. Une sur-expression épithéliale inhibe la migration

mais conduit aussi à la perte du phénotype adhérent, favorisant alors la tumorigénèse et l'invasion (Beauvais et coll., 2004 ; Anttonen et coll., 2001 ; Lundin et coll., 2005 ; Shinnyo et coll., 2005). A l'inverse, la sous-expression de la molécule induit la transformation des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses et l'augmentation de la migration cellulaire.

Par ailleurs, les effets du syndecan-1 sur la progression tumorale et le pronostic sont différents si le syndecan-1 est situé sur les cellules tumorales ou synthétisé par le stroma-hôte. Son expression sur les cellules stromales favorise ainsi la progression tumorale (Juuti et coll., 2005 ; Leivonen et coll., 2004 ; Mukunyadzi et coll., 2003 ; Wiksten et coll., 2001 ; Maeda et coll., 2006).

V.3.2. Le syndecan-1 dans le Myélome Multiple (MM)

V.3.2.1. Expression et fonction du syndecan-1 dans le MM

L'origine des cellules de myélome clonogéniques / tumorigènes reste controversée, et il est actuellement difficile de savoir si elles sont issues des cellules B, des plasmablastes ou des plasmocytes. L'expression du CD19, CD20 et CD138 distingue clairement les cellules B (CD19⁺ CD20⁺ CD138⁻) des plasmablastes (CD19⁺ CD20⁻CD138⁻) et des cellules plasmiques (CD19^{+/-} CD20⁻ CD138⁺) (Jego et coll., 2001). Les travaux de la dernière décennie ont fourni la preuve que le syndecan-1 était un régulateur majeur du microenvironnement de la moelle osseuse et qu'il contribuait à la croissance tumorale et au développement des métastases. Il a été d'abord décrit l'expression du syndecan-1 à la surface des cellules myélomateuses puis l'expression du syndecan-1 est devenue un marqueur standard utilisé par de nombreux laboratoires pour l'identification et la purification de cellules de myélome (Wijdenes et coll., 1996 ; Bayer-Gardner et coll., 2001). Le syndecan-1 n'est pas exprimé sur les lymphocytes B mais devient présent à l'apparition de cellules plasmiques différenciées (Sanderson et coll., 1989). Le niveau d'expression du syndecan-1 est élevé sur les cellules myélomateuses, mais, fait intéressant, de hauts niveaux d'expression de syndecan-1 ont été également retrouvés sur les cellules plasmiques normales dans la moelle osseuse (Zhan et coll., 2003).

Le syndecan-1 joue le rôle de médiateur dans l'adhésion des cellules myélomateuses au collagène, inhibe l'invasion à travers des gels de collagène et peut également servir de médiateur dans l'adhésion cellules-cellules du myélome (Ridley et coll., 1993). Le shedding du syndecan-1 peut être dû à des stimuli externes ou à l'apoptose des cellules myélomateuses (Fitzgerald et coll., 2000). Le syndecan-1 est présent en grande quantité dans le sérum de certains patients atteints de myélome, et sur la base de données cliniques, il a été supposé que cela était un indicateur de mauvais pronostic (Dhodapkar et coll., 1997). Cette hypothèse a été confirmée par Siedel et al. qui a démontré qu'un niveau élevé de syndecan-1 soluble était un facteur prédictif indépendant de mauvais pronostic dans le myélome tant au diagnostic qu'en phase stationnaire de la maladie (Siedel et coll., 2000 ; Lovell et coll., 2005). En outre, il a été constaté que chez les patients atteints de myélome, le syndecan-1 soluble se retrouvait piégé dans la matrice extracellulaire de la moelle osseuse et de régions de fibrose médullaire (Bayer-Garner et coll., 2001). Il a été émis l'hypothèse que le syndecan-1 soluble favorise la croissance tumorale du myélome (Yang et coll., 2002). Les sheddases responsables du clivage du syndecan-1 des cellules de myélome n'ont pas été identifiées mais une étude sur des lignées cellulaires myélomateuses a suggéré que l'excrétion du syndecan-1 pourrait se faire par une activité non-protéasique (Holen et coll., 2001). Des études récentes ont également établi que l'expression de l'héparanase augmentait l'expression et le clivage du syndecan-1 (Mahtouk et coll., 2007). Des études récentes ont également montré que le taux de syndecan-1 soluble était corrélé à une densité accrue des micro-vaisseaux tumoraux, (Andersen et coll., 2005).

Comment le syndecan-1 augmente la croissance du myélome?

La croissance et le développement de myélome dépendent de signaux provenant du microenvironnement de la moelle osseuse (Roodman et coll., 2002). Les molécules de signalisation qui contribuent à la progression des tumeurs du myélome sont multiples (Anderson et coll., 2002). Parce que beaucoup de ces molécules de signalisation résident dans la moelle osseuse (par exemple, IL-6, IL-7, IL-8, HGF, FGF-2, VEGF, famille du EGF), elles ont la capacité de se lier, et d'être régulées par l'héparane sulfate,

qui agit comme un médiateur clé de la signalisation d'activité dans le myélome (Derksen et coll., 2002).

V.3.2.2. Syndecan-1 comme cible thérapeutique pour le MM

Ces constatations nous amènent à conclure qu'une fonction clé du syndecan-1 est de faciliter l'intégration des cellules tumorales du myélome et de l'hôte contribuant ainsi à créer et maintenir la tumeur comme un « organe ». La figure 19 montre un modèle où l'on voit que le syndecan-1 a un impact sur plusieurs voies de signalisation dans le microenvironnement de la tumeur menant à la croissance des tumeurs agressives.

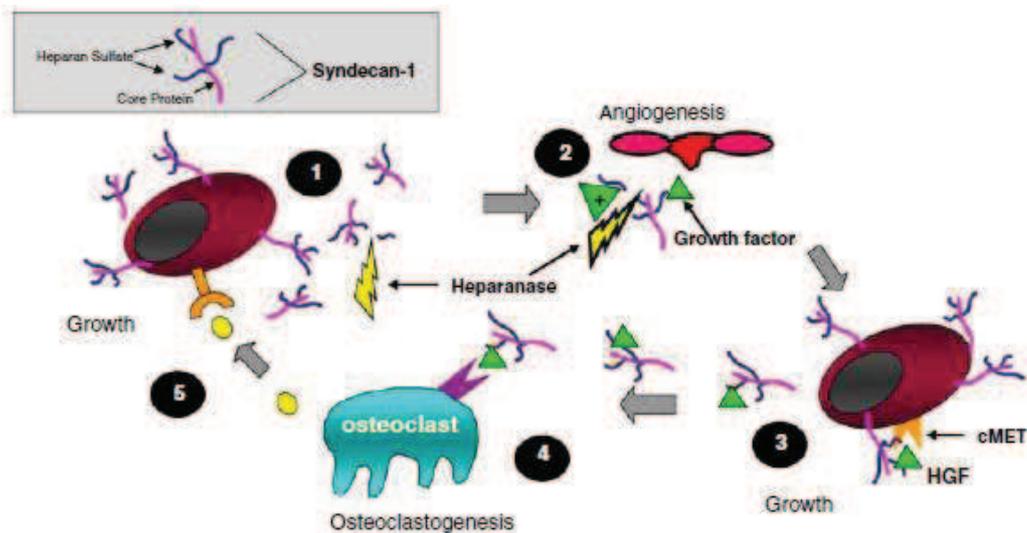


Figure 19 : Modèle montrant l'expression et la fonction du syndecan-1 dans le microenvironnement du myélome (d'après Sanderson et coll., 2008). (1) Les cellules myélomateuses clivent le syndecan-1 qui s'accumule dans le stroma de la moelle osseuse (2), où il concentre des facteurs de croissance et stimule l'angiogénèse. L'héparanase alimente le processus en augmentant le clivage du syndecan-1 et en libérant des facteurs de croissance liés à la MEC. Ce facteur de croissance soutient l'ensemencement des cellules de myélome dans le stroma (3) qui prolifèrent en réponse à la signalisation via le complexe HGF/syndecan-1/cMET et autres. Ces cellules prolifératives du myélome libèrent des facteurs stimulant ostéoclastogénèse (4). Une fois activés, les ostéoclastes sécrètent des facteurs inconnus supplémentaires qui stimulent la croissance du myélome (5). Ce modèle représente une fraction des interactions entre le syndecan-1 et l'héparane sulfate dans le microenvironnement du myélome.

L'hypothèse, que le ciblage du syndecan-1 dans le microenvironnement du myélome pourrait arrêter ou atténuer de multiples voies essentielles à la croissance tumorale inhibant ainsi la croissance et la progression de ce cancer, a été avancée. Le blocage de la fonction du syndecan-1 aurait une probabilité plus élevée d'impact sur la croissance tumorale que ne le font les thérapies ciblant une seule voie (Zhan et coll., 2006).

Pour tester cette hypothèse, des équipes ont proposé différentes stratégies sur des modèles animaux de myélome comme la dégradation de la chaîne héparane sulfate ou l'inhibition de l'héparanase. La dégradation de la chaîne héparane sulfate in vivo par une héparinase III bactérienne a montré un blocage de la pousse tumorale osseuse du myélome de plus de 80% par rapport au groupe contrôle. Pour étudier l'effet de l'inhibition de l'héparanase, une héparine modifiée chimiquement, qui ne possède plus de propriété anticoagulante mais est potentiellement inhibitrice de l'enzyme héparanase, a été utilisée. Une réponse complète a été observée sur 5 animaux sur 6 avec une posologie de 36 mg/kg/j. (Yang et coll., 2007). D'autres équipes ont choisi d'autres voies de recherche en s'appuyant sur le niveau élevé d'expression du syndecan-1 sur les cellules MM et son absence sur la surface des cellules médullaires normales. De ce fait, le syndecan-1 semble être une cible pertinente pour la RIT du MM. Le ciblage sélectif des cellules cancéreuses par des radionucléides ou des toxines en utilisant les AcM est un sujet d'intérêt considérable. Il a été montré qu'un AcM anti-CD138, le B-B4, se liait préférentiellement au CD138 membranaire plutôt qu'à la forme soluble (Wijdenes et coll. 2002). Le B-B4 semble incapable de se lier au CD138 soluble s'il n'est pas déjà apparié à un autre anticorps parce qu'il a besoin de cet appariement induisant un changement conformationnel pour se fixer au CD138 soluble (Dr Wijdenes, le Dr Klein, communications personnelles). Le B-B4 est un AcM murin (IgG1) qui se lie à un épitope linéaire entre les résidus 90 à 95 de la « core » protéine de l'homme (Wijdenes et coll. 1996). L'efficacité de la RIT utilisant un AcM anti-syndecan-1 a été démontrée dans des études précliniques, notamment en utilisant des émetteurs alpha (McDevitt et coll., 1998). Par exemple, l'incubation de trois lignées cellulaires de myélome multiple avec le B-B4 mAb marqué au ²¹³Bi (Couturier et coll., 1999) conduit à une forte mortalité des cellules de myélome, dose-dépendante, toutes les cellules étant tuées par une activité

de 30 kBq pour 10^5 cellules. L'apoptose a été montrée comme étant impliquée dans la réponse cellulaire à une activité de 7,4 kBq pour 10^5 cellules et la mortalité non spécifique était faible. Une autre étude a montré que le B-B4 marqué au ^{213}Bi induit une mortalité spécifique et un arrêt en phase G2/M du cycle cellulaire, qui dépend de la concentration et l'activité spécifique (Supiot et coll., 2002). Avec le B-B4 marqué au ^{213}Bi , l'arrêt en phase G2/M est vite apparu, dans les 24 heures après l'irradiation, et a touché près de 60% des cellules (pour 20 nM de ^{213}Bi -B-B4 à 1200 MBq/mg). Une étude plus récente (Cherel et coll., 2009), a évalué la toxicité et l'efficacité d'un anticorps anti-souris CD138 marqué au ^{213}Bi dans un modèle de myélome de souris 5T33 implanté chez des souris syngéniques C57BL/KaLwRij. Avec 3,7 MBq, une légère toxicité hématologique réversible a été observée, associée à une augmentation de survie à long terme. Compte tenu des résultats de ces études, une étude de phase I a été conçue pour transférer la RIT anti-CD138 à la clinique. Nous rapportons l'étude de biodistribution préliminaire et les résultats de dosimétrie obtenus chez les patients MM réfractaires dans une phase I/II de RIT étude utilisant l'anticorps monoclonal anti-CD138 (B-B4) marqué à l'iode-131 (Rousseau et coll., 2012 en annexe). Quatre patients atteints de maladie progressive ont été inclus après trois lignes de traitement. Une toxicité de grade III a été retrouvée sur la lignée plaquettaire chez 2 patients (dosimétrie la plus élevée sur la moelle osseuse), et aucune toxicité de grade IV hématologique n'a été observée. Chez un patient une réponse partielle a été observée, avec une réduction de 60% du pic d'IgG sur l'électrophorèse du sérum, et le soulagement total de ses douleurs rachidiennes pendant 1 an. Il serait intéressant d'effectuer une étude de RIT β - ou α de phase I/II avec un anticorps humanisé anti-CD138 avec escalade de dose et perfusion systématique de cellules souches autologues pour éviter toute toxicité hématologique et obtenir une efficacité.

D'autres ont choisi de cibler le CD138 avec des toxines. Tassone et coll. (Tassone et coll., 2004) a décrit la première le potentiel de ciblage tumoral avec un anticorps-maytansinoïd conjugué anti-CD138 (B-B4 murin). Le traitement des cellules CD138+ avec B-B4-DM1 avait diminué de façon significative la survie des cellules, de manière dose-dépendante, tandis que l'anticorps B-B4 seul avait peu d'activité. L'activité anti-tumorale de B-B4-DM1 a été évaluée dans des études de xénogreffes chez la souris MM.

Des régressions tumorales marquées ont été observées après traitement avec B-B4-DM1 dans les modèles sous-cutanés MM. L'activité anti-tumorale de B-B4-DM1 a été confirmée dans un modèle souris SCID-hu de MM humain, où les cellules des patients MM proliféreraient dans un microenvironnement de fragment d'os humain. Un autre AcM est en développement par Biotest AG : l'AcM anti-CD138 (nBT062) qui est un AcM chimérique (IgG4) conjugué au maytansinoïd. Ikeda et coll.(Ikeda et coll., 2009) a confirmé que, comme le B-B4-DM1, le BT062 montre une cytotoxicité puissante et CD138-dépendante contre les cellules MM CD138+ in vitro et in vivo. Une étude multicentrique de phase I en escalade de doses de BT062- DM1 chez des sujets présentant une rechute ou un myélome réfractaire est actuellement en cours (Clinicaltrials.gov : NCT00723359).

V.3.3. L'implication du syndécan-1 dans le tissu mammaire

- Dans le sein normal

Chez la femme non ménopausée indemne de cancer du sein, il a été démontré récemment, que l'expression du syndécan-1 dans le sein variait en fonction de la phase du cycle menstruel avec une diminution de l'expression du proteoglycane lors de la phase lutéale (Hallberg et coll., 2010). D'autre part, la sur-expression du syndécan-1 était associée à une augmentation de la densité mammaire à la mammographie ainsi qu'à une redistribution de l'expression du syndécan-1 de l'épithélium vers le stroma chez la femme non malade ménopausée (Lundstrom et coll., 2006). Il existe donc dans le sein normal, des variantes topographiques de l'expression de cet antigène qui peut être influencé par l'imprégnation hormonale.

- Dans le cancer du sein

L'expression du syndécan-1 par les fibroblastes dans le stroma tumoral semble être nécessaire pour la carcinogenèse du sein (Alexander et coll., 2000) et peut promouvoir la tumorigenèse en régulant la propagation et l'adhérence des cellules tumorales (Beauvais et coll., 2003), la prolifération et l'angiogenèse (Maeda et coll., 2004 ; Maeda et coll., 2006 ; Löfgren et coll., 2007). La diminution de l'expression du syndécan-1 sur les cellules épithéliales de la tumeur et l'augmentation de cette expression sur les

cellules stromales a deux conséquences : tout d'abord le changement phénotypique des cellules épithéliales tumorales et des cellules mésenchymateuses correspond à une dédifférenciation donc au passage à une tumeur invasive (Mennerich et coll., 2004). De plus, il est observé une mobilisation de facteurs de croissance tels que l'hépatocyte growth factor et le basic fibroblast growth factor de la surface des cellules tumorales épithéliales vers la matrice extracellulaire (Joensuu et coll., 2002 ; Seidel et coll., 2000). Ces deux conséquences peuvent contribuer au caractère invasif des cellules tumorales et au développement des métastases et s'observe dans plus de 70% des cancers du sein (Maeda et coll., 2006). Cette interaction entre le stroma et les cellules tumorales mammaires dépend de l'importance de la représentation du syndecan-1 sur les fibroblastes (Maeda et coll., 2004). Comme nous venons de le voir, la perte de l'expression épithéliale du syndecan-1 a été associée à un mauvais pronostic dans différentes formes de cancers mais pour le cancer du sein, les données sont parfois contradictoires et restent encore très débattues de nos jours. Babareschi et coll. a montré le premier qu'une forte expression du syndecan-1 était associée à un grade histologique élevé, à une tumeur volumineuse, un index mitotique élevé, une surexpression de Her2 et à un statut ER et PR négatif. Lors de l'analyse de survie univariée, ils ont montré que la surexpression du syndecan-1 était liée à un mauvais pronostic ($P= 0,01$) pour la survie globale et la survie sans récurrence des patientes. L'analyse de survie bivariée a montré un effet additif néfaste du syndecan-1 et de la surexpression Her2. En analyse multivariée, la surexpression du syndecan-1 était un facteur péjoratif indépendant pour la survie globale ($p=0,03$; HR, 2,15) (Barbareschi et coll., 2003). Leivonen et coll., de son côté s'est intéressé à la localisation de l'expression du syndecan-1 et à son éventuelle incidence. Il a montré que l'expression épithéliale mais aussi l'expression conjointe épithéliale et stromale du syndecan-1 étaient des facteurs de mauvais pronostic dans le cancer du sein. En revanche, la perte de l'expression épithéliale était associée à un bon pronostic contrairement à ce qui avait été démontré auparavant (Leivonen et coll., 2004). Dans le même sens, l'équipe de Baba a montré en stratifiant sur l'intensité de l'expression du syndecan-1, une survie globale moins bonne en cas de forte expression: figure 20.

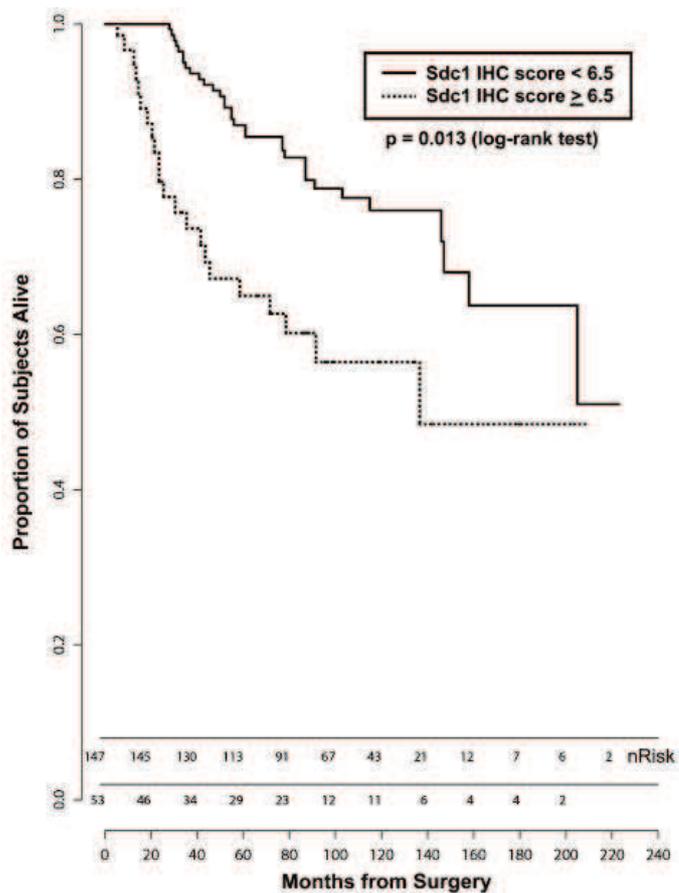


Figure 20 : une forte expression du syndecan-1 est associée à un mauvais pronostic. Courbe de Kaplan-Meier de survie globale stratifiée sur l'expression du syndecan-1 (forte ou faible). (d'après Baba et coll. 2006)

En revanche, cette même équipe, contrairement à celle de Babareschi n'a pas retrouvé de valeur pronostique indépendante pour l'expression du syndecan-1 lors de leur analyse multivariée.

Loussouarn et coll., ont corrélié l'expression du syndecan-1 à des paramètres clinicopathologiques et à la survie sans rechute. Dans leur étude (80 patientes), une expression exclusive épithéliale du syndecan-1 était constatée chez 60% des patientes, alors qu'une expression stromale ne représentait que 30% des cas et l'association des 2 une minorité (10%) : figure 21.

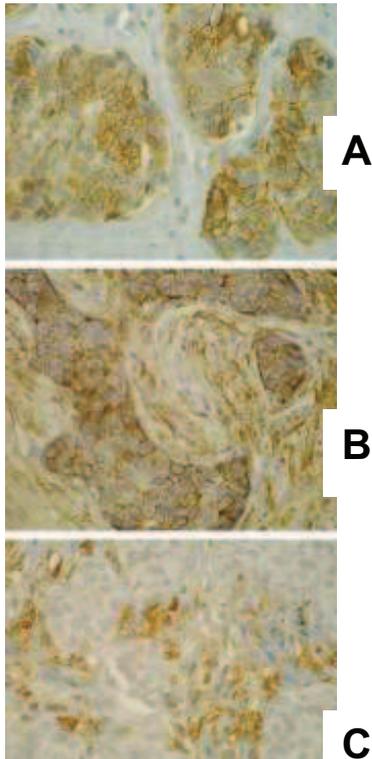


Figure 21 : Immunomarquage du syndecan-1

(d'après Loussouarn et coll., 2008)

(A) Immunomarquage au syndecan-1 épithélial intense sans marquage stromal. (B) Immunomarquage au syndecan-1 tant épithélial stromal. (C) Immunomarquage au syndecan-1 uniquement stromal.

Contrairement à l'équipe de Leivonen et de manière isolée dans la littérature, une corrélation significative a été trouvée entre d'une part la perte de l'expression épithéliale (E-) du syndecan-1 avec expression stromale (S+) et d'autre part un haut grade de malignité ($p=0,001$). La perte de l'expression épithéliale du syndecan-1, étant elle, corrélée à la survie sans rechute ($p=0,001$) et péjorative. L'analyse multivariée réalisée dans cette étude a montré que seule la perte de l'expression épithéliale du syndecan-1 était pronostique ($p=0,001$) comme montré sur la figure 22. Il est à noter que l'effectif, de cette dernière étude, était limité (80 patientes) par rapport aux précédentes (200-300 patientes) (Loussouarn et coll., 2008).

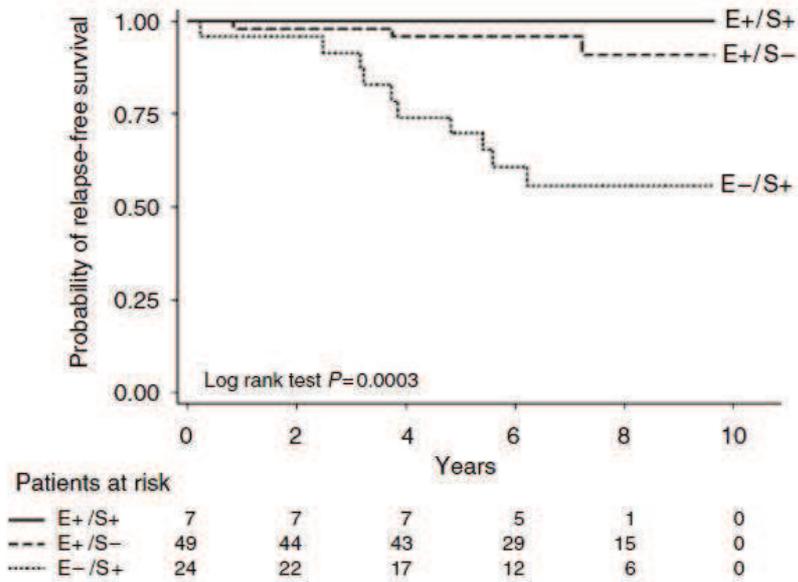
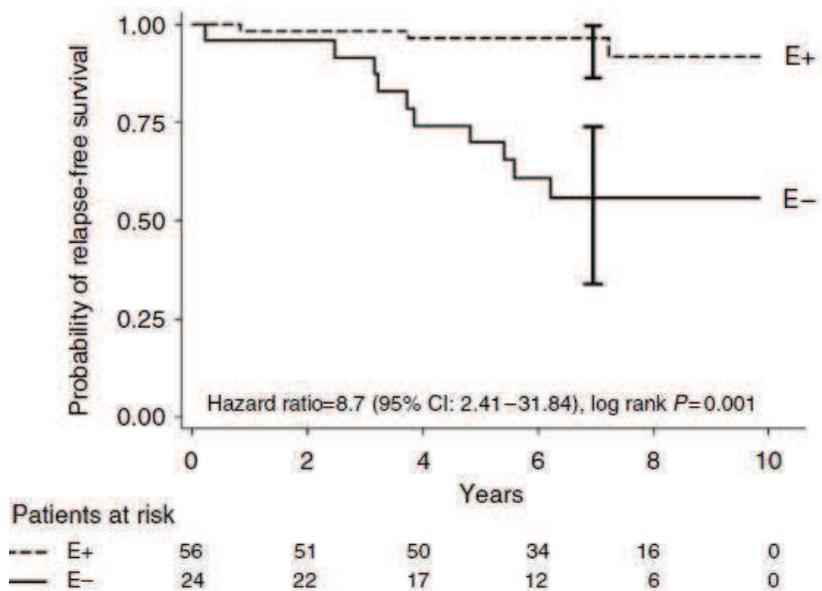


Figure 22 : Courbes de survie sans rechute de Kaplan-Meier selon l'expression du syndecan-1 épithéliale et/ou stromale (d'après Loussouarn et coll., 2008)



Devant l'impact de la présence ou non du syndecan-1 dans le cancer du sein, sur la survie des patientes, l'équipe de Götte s'est intéressée à la valeur prédictive de l'expression du syndecan-1 pour la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante puisque ces patientes bénéficient de ce type de traitement. Ils ont montré que la réponse

anatomopathologique à la chimiothérapie était diminuée chez les patientes exprimant le syndécan-1. De plus, aucune patiente exprimant le syndécan-1 n'a montré une rémission complète et 20% des tumeurs non-répondeuses avaient une forte expression du syndécan-1+ (Götte et coll., 2006). L'expression du syndécan-1 semble donc affecter les patientes d'une double manière : d'abord son expression est un facteur de moins bon pronostic et il semble affecter, bien que la série soit de petite taille, la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante.

Toutes les études dans le cancer du sein montrent l'influence de l'expression du syndécan-1 et surtout de son impact en fonction de sa localisation sur le devenir des patientes. Récemment, une autre étape a été franchie avec la démonstration que le syndécan-1 présent dans le stroma altérait la composition de la MEC ainsi que son architecture tant *in vivo* qu'*in vitro* et que cette modification architecturale des fibres de la MEC facilitait la migration directionnelle des cellules du cancer du sein, figure 23 (Yang et coll., 2011).

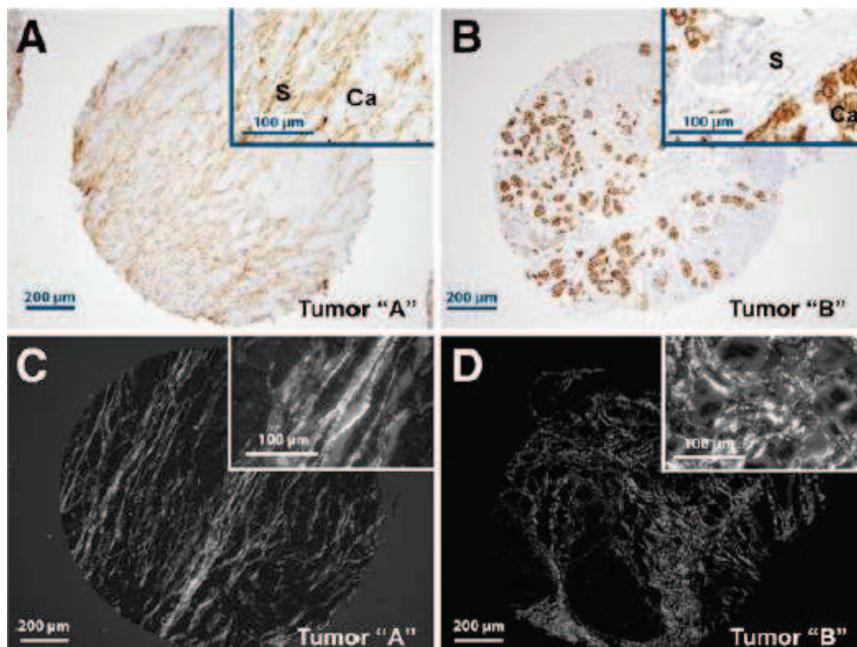


Figure 23 : dans le cancer du sein, l'expression stromale du syndecan-1 est corrélée avec une architecture de la MEC en fibres parallèles.

(A et B) : coupes de paraffine de cancers du sein avec un immunomarquage avec un AcM anti-syndecan-1. La tumeur A montre une expression stromale du syndecan-1 alors que pour la tumeur B cette expression est absente et seule le marquage des cellules carcinomateuses est visualisé. (C et D) : coupes des micro-réseaux colorés avec la méthode picro-sirius rouge et microscopie de polarisation. Ce colorant se lie aux fibres de collagène. (d'après Yang et coll., 2011)

Peu d'études se sont intéressées à la forme soluble du syndecan-1 dans le cancer du sein. Toutefois, Nikolova et coll. ont rapporté que la conversion protéolytique du syndecan-1 en une molécule soluble marquait le passage d'un phénotype tumoral prolifératif en un phénotype invasif avec des implications pour le diagnostic du cancer du sein et de potentielles thérapies dirigées vers les glycoaminoglycanes (GAGs) (Nikolova et coll., 2009). Au stade précoce de la progression tumorale, des approches compétitives au niveau des GAGs ciblant l'interaction du syndecan-1 avec le facteur de croissance apparaissent comme une stratégie anti-proliférative prometteuse. D'autre part, le fait, que l'héparanase induisait le clivage du syndecan-1 membranaire par une

protéase et donc majorait l'invasion tumorale (Yang et coll., 2007), pouvait conduire à une approche anti-métastatique avec l'utilisation d'inhibiteurs du clivage du syndecan-1 (anti-protéase) et de l'héparanase au stade tardif du cancer du sein (Götte et coll., 2006).

Références bibliographiques	Expression du syndecan-1	Conséquences cliniques
Barbareschi et coll., 2003	Surexpression du syndecan-1	Mauvais pronostic (survie sans récurrence, survie globale et facteur péjoratif indépendant pour survie globale)
Leivonen et coll., 2004	Expression épithéliale (E+) du syndecan-1	Mauvais pronostic
	Expression épithéliale et stromale (E+/S+) du syndecan-1	
	Perte expression épithéliale (E-) du syndecan-1	Bon pronostic
Baba et coll., 2006	Forte expression du syndecan-1	Mauvais pronostic, pas de valeur pronostique indépendante
Götte et coll., 2006	Forte expression syndecan-1	Evolution défavorable et mauvaise réponse à la chimiothérapie néoadjuvante
Loussouarn et coll., 2008	Perte expression épithéliale associée à expression stromale (E-/S+) du syndecan-1	Haut grade de malignité
	Perte expression épithéliale (E-) du syndecan-1	Corrélation à la survie sans récurrence et de mauvais pronostic
Nikolova et coll. 2009	Présence de syndecan-1 soluble	Passage d'un phénotype prolifératif à invasif
Yang et coll., 2011	Expression stromale du syndecan-1	Facilitation de la migration des cellules du cancer

Tableau 5 : Syndecan-1 et cancer du sein

CHAPITRE II. *OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE*

CHAPITRE II. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

L'expression du syndecan 1 dans les cellules tumorales et/ou stromales du cancer du sein en fait une cible intéressante pour l'immuno-ciblage des cancers du sein triple négatif dont les cellules n'expriment plus ou pas à leur surface des antigènes comme Her2/neu ou des récepteurs hormonaux. La cible peut être utilisée pour des applications thérapeutiques par RIT ou une imagerie phénotypique spécifique par immuno-TEP.

Ce travail de thèse avait pour objectifs d'étudier la faisabilité de la RIT et de l'immuno-TEP avec l'AcM anti-CD138 (B-B4) radio-marqué avec des isotopes de l'iode dans un modèle animal de xénogreffe sous-cutanée de cancer du sein TN.

Les différentes étapes du travail ont été les suivantes :

- Evaluation de la biodistribution ^{125}I -B-B4 chez des souris NMRI-nu (nu/nu) greffées avec la lignée cellulaire humaine MDA-MB-468 de cancer du sein triple négatif.
- Evaluation de la toxicité de la RIT avec ^{131}I -B-B4 dans le cadre d'une étude avec escalade de dose chez des souris.
- Etude de l'efficacité de la RIT avec ^{131}I -B-B4 chez des souris NMRI-nu (nu/nu) greffées avec la lignée cellulaire MDA-MB-468.
- Etude de la faisabilité de l'immuno-TEP avec l' ^{124}I -B-B4 chez l'animal, en comparaison avec la TEP au ^{18}F FDG et à la ^{18}F FLT.

CHAPITRE III. ETUDES PRECLINIQUES

I. Radioimmunothérapie ciblant le syndecan-1 avec l'anticorps B-B4 marqué à l'iode 131 dans un modèle de xénogreffe de cancer du sein triple négatif

I. Résumé

La surexpression du syndecan-1 (CD138) dans le cancer du sein est corrélée à un mauvais pronostic et à un phénotype agressif. L'objectif de cette étude a été d'évaluer la RIT avec l'anticorps monoclonal humain B-B4 (anti-CD138) marqué à l'iode 131 chez la souris *nude* préalablement greffée avec une lignée humaine de cancer du sein triple négatif (MDA-MB-468).

L'immunoréactivité et l'affinité du ^{125}I -B-B4 pour les cellules MDA-MB-468 ont été déterminées par une analyse Scatchard. L'étude immuno-histochimique a été réalisée sur des coupes de tumeur. L'étude de la biodistribution du ^{125}I -B-B4 a été réalisée 4, 24, 48, 72 et 96 heures après l'injection, chez des souris greffées en sous-cutané avec la lignée MDA-MB-468 et comparée à la biodistribution d'un anticorps ne ciblant pas le syndecan-1 et de même isotype que le B-B4. L'étude de biodistribution a été suivie d'une étude avec escalade de doses pour déterminer la dose maximale tolérée (DMT) de ^{131}I -B-B4. La toxicité et l'efficacité de la RIT avec ^{131}I -B-B4 ont été évaluées.

L'affinité du ^{125}I -B-B4 avait un ordre de grandeur nanomolaire ($K_d=4,39\pm 1,10$ nM). La lignée MDA-MB-468 exprimait relativement peu de sites antigéniques CD138 ($B_{\max}=1,19.10^4\pm 9,27.10^2$ sites antigéniques/cellules) mais l'immunomarquage à l'aide du B-B4 permettait de révéler *in vivo* la présence du CD138 membranaire. La fixation tumorale du ^{125}I -B-B4 a atteint un maximum de 14% de l'activité injectée par grammes, 24h après l'injection de l'immunoconjugué et était supérieure à celle de l'anticorps non spécifique de même isotype (5%ID/g à 24h). La DMT a été fixée à 22,2 MBq. Chez les 8 souris traitées à la DMT, il a été observé 3 réponses partielles, 5 réponses complètes, avec une absence de repousse de la tumeur 95 jours après le traitement pour 3 d'entre elles.

Ces résultats démontrent que la RIT avec le ^{131}I -B-B4 pourrait être considérée comme une alternative thérapeutique du cancer du sein triple négatif métastatique.

I.2. Matériel et Méthodes

I.2.1. Lignée cellulaire

Le modèle de cancer du sein triple négatif a été développé sur souris *nude* NMRI-nu (nu/nu), à partir d'une lignée humaine de cancer du sein, MDA-MB-468, obtenue auprès de l'ATCC (HTB-132). Cette lignée a été isolée à partir d'un épanchement pleural d'une patiente atteinte d'un carcinome mammaire métastatique. C'est une lignée cellulaire basal-like, ER-, PR-, HER2-, EGFR+, CK 5/6+ et vimentine- (Voss et coll., 2011) et CD138+ (Matsuda et coll., 2001). La culture de la lignée est simple et la greffe des tumeurs sur souris *nude* ne nécessite pas l'utilisation d'un traitement hormonal concomitant .

La capacité de l'AcM à reconnaître le syndecan-1 exprimé à la surface de la lignée MDA-MB-468 a été préalablement évaluée par un marquage au cytomètre (CRCNA U892).

I.2.2. Modèle animal

Les souris *nude* âgées de 8 à 10 semaines ont été greffées en sous-cutané avec 5.10^6 de cellules MDA-MB-468. Une solution de Lugol à 0,1% est ajoutée à l'eau de consommation (0,1ml/100ml) deux jours avant la RIT et pendant les deux semaines qui suivent l'injection. Les souris ont été traitées 24 jours après la greffe, lorsque les tumeurs ont atteint un volume de $108 \pm 55 \text{ mm}^3$.

I.2.3. Immunoréactivité et affinité du ^{125}I -B-B4

L'anticorps utilisé était l'AcM B-B4 anti-CD138 (IgG1). Cette IgG1 de souris nous a été fourni par la société Diaclone (Besançon, France).

Il a été vérifié que le couplage B-B4 / ^{125}I ne modifiait pas l'affinité et la liaison du B-B4 sur le syndecan-1, en évaluant l'immunoréactivité de l'AcM après radiomarquage par « le test de Lindmo » en utilisant des cellules CD138+ (U266) (Lindmo et coll., 1984).

L'affinité du B-B4 a été déterminée par un test de fixation à l'équilibre (analyse Scatchard). L'analyse des résultats ont été réalisés à l'aide du logiciel Prism par une régression non linéaire de type « one binding site ».

I.2.4. Immunohistochimie tumorale

L'immunomarquage a été réalisé par une technique d'amplification streptavidine-biotine peroxydase standard (ChemMate kit, Dako, Glostrup, Denmark). Un anticorps primaire spécifique du syndecan-1 (clone M115, 1 :100, Dako) a permis de mettre en évidence la présence de CD138 sur les coupes de tumeurs. L'anticorps secondaire biotinylé a été ensuite appliqué puis le complexe streptavidine-biotine peroxydase a été déposé. Les coupes ont été aussi colorées par Hematoxylin Harris (Merck, France). Pour les contrôles négatifs, la procédure d'immunomarquage a été réalisée en omettant l'anticorps primaire.

I.2.5. Etude de biodistribution du ^{125}I -B-B4

Cette étape a permis de suivre la distribution et la fixation du ^{125}I -B-B4 au sein des différents organes des souris *nude* greffées avec la lignée MDA-MB-468. Une activité de 4 MBq de ^{125}I -B-B4 a été injectée en I.V. Le prélèvement des organes a été réalisé à 4, 24, 48, 72 et 96 heures après l'injection. La radioactivité de chaque organe a été mesurée au compteur γ et le pourcentage de l'activité injectée par gramme (%ID/g) calculé.

I.2.6. Etude d'escalade d'activité et de RIT avec ^{131}I -B-B4

Dans un premier temps, l'étude de la croissance tumorale a été évaluée après administration de l'AcM B-B4 non radiomarké (n=5) ou d'une solution de PBS (n=5) pour mesurer l'activité intrinsèque de l'AcM non radiomarké.

Une escalade d'activité de 11,1 MBq à 37 MBq (11,1-14,8-18,5-22,2-25,9-37 MBq) d' ^{131}I -B-B4 a été réalisée chez 7 groupes de 3 à 4 souris chacun. Un groupe de souris témoin a été constitué (injection de PBS seule). Une quantité constante de B-B4 a été administrée (120 μg). La DMT a été définie comme étant le palier d'activité juste inférieur à celui générant aucun décès de souris ni aucune perte de poids supérieure à 10% durant les 96 jours de l'étude.

Parallèlement, une étude de toxicité a été menée : les souris ont été pesées une fois par semaine durant 96 jours. Des prélèvements de sang ont été recueillis à J0, J14, J28, J40, J55 et J90 après l'injection du ^{131}I -B-B4. Le nombre de leucocytes et de plaquettes a été mesuré à l'aide d'un compteur de cellules automatisé (Melet-Schloesing Laboratories, Cergy-Pontoise- France).

Une étude complémentaire de RIT a été réalisée dans les mêmes conditions que celles sus décrites, en utilisant la dose maximale tolérée (DMT) soit 22,2 MBq et à une activité intermédiaire (14,8 MBq) avec 4 souris dans chaque groupe. On a comparé les résultats obtenus à ceux d'un groupe témoin n'ayant reçu qu'une injection de PBS (n=5). Les volumes tumoraux ont été mesurés 2 fois par semaine pendant 96 jours, à partir de la longueur (L), de la largeur (l) et de l'épaisseur (e) de la tumeur.

Les paramètres utilisés pour évaluer l'efficacité de chaque type de traitement sont le volume minimal relatif (rapport du plus petit volume tumoral sur le volume tumoral initial avant traitement) et le temps requis pour que la tumeur double son volume initial. La moyenne des volumes tumoraux a été calculée pour chaque groupe et chaque mesure. La qualité de la réponse tumorale a été définie : la disparition totale de la tumeur sans récurrence jusqu'à la fin de l'étude (≥ 96 jours) ; la réponse complète (RC) qui correspond à la disparition de la tumeur pendant au moins 7 jours suivie d'une récurrence ; la réponse partielle (PR) se traduisant par une diminution du volume tumoral d'au moins 50% pendant au moins 7 jours suivie d'une récurrence.

Des analyses statistiques ont été réalisées.

I.3. Résultats

I.3.1. Immunoréactivité et affinité

Les résultats sont présentés sur la figure 24. L'affinité (constante de dissociation) de l'AcM B-B4 a été mesurée à $4,39 \pm 1,10$ nM. La densité antigénique de la lignée MDA-MB-468 a été évaluée à $1,19 \cdot 10^4 \pm 9,27 \cdot 10^2$ sites antigéniques par cellules, ce qui est peu mais en accord avec les données de la littérature où cette lignée de cancer du sein est connue pour être celle qui exprime le moins le syndecan-1 (Burbach et coll., 2003).

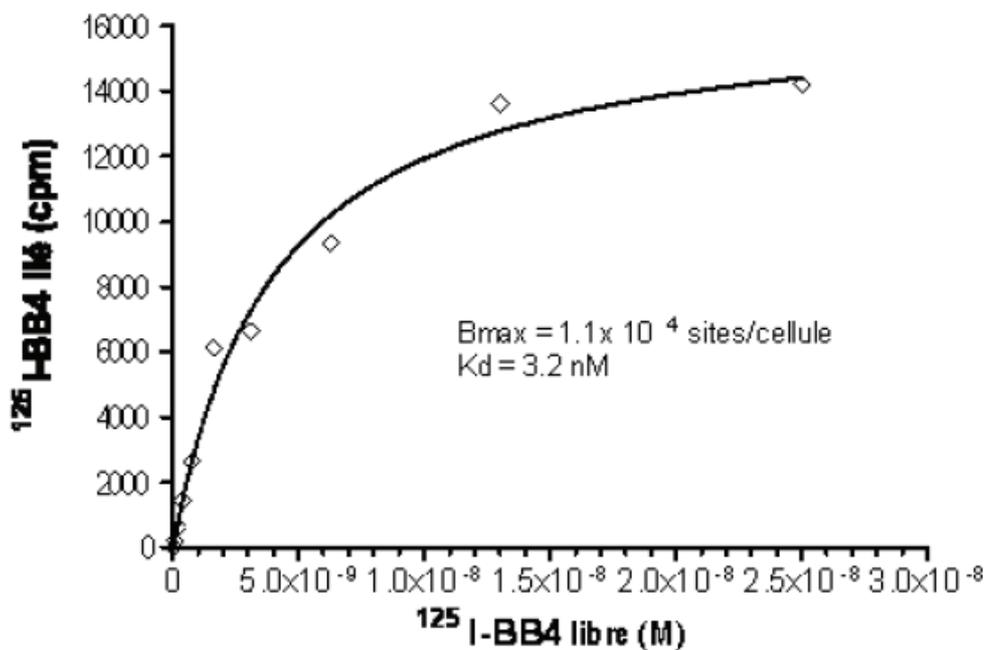


Figure 24 : Etude de la liaison à l'équilibre du ^{125}I -B-B4 sur la lignée MDA-MB-468. Cette figure représente la fixation spécifique en fonction de la fraction libre du ^{125}I -B-B4. La fixation non spécifique du radioimmunoconjugué évaluée en excès d'anticorps non radiomarqué a été soustraite à la fixation totale de l'anticorps radiomarqué. Le B_{max} représente le nombre de sites par cellule et la constante de dissociation (K_d) correspond à l'inverse de la constante d'affinité.

L'immunoréactivité du ^{125}I -B-B4 a été évaluée à 80% (Figure 25). Ce test confirmait que le marquage du B-B4 avec l'iode 125 perturbait peu le site de liaison à l'antigène CD138.

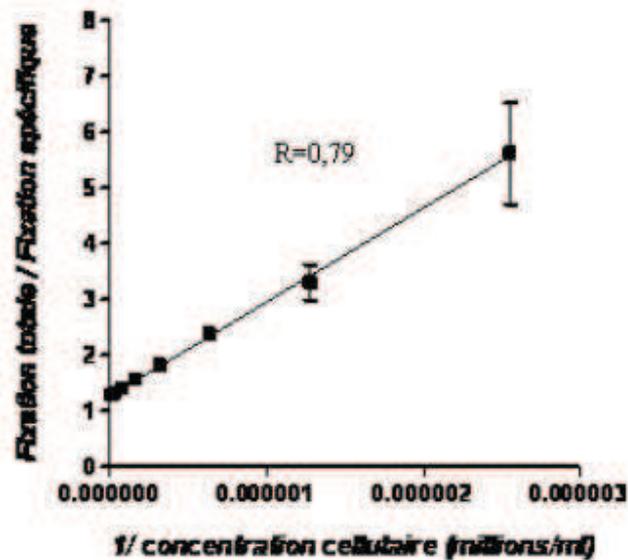


Figure 25 : Immunoréactivité du 125I-B-B4. Détermination de la fraction immunoréactive du ^{125}I -B-B4 à partir d'une concentration constante du radioimmunoconjugué sur une gamme de concentration de la lignée U266 de myélome multiple humain exprimant le CD138. Le facteur R représente l'inverse de l'ordonnée à l'origine, qui correspond à la fraction immunoréactive du 125I-B-B4 selon la méthode de Lindmo (Lindmo et coll., 1984).

1.3.2. Immunohistochimie

Pour valider la lignée MDA-MB-468 comme modèle pré-clinique pour le ciblage du syndecan-1, il a été nécessaire d'évaluer l'expression du CD138 sur des coupes de tumeur prélevée sur une souris *nude* préalablement greffée avec la lignée MDA-MB-468. La figure 26 en représente les résultats. On remarque que les trabécules du tissu mammaire sont associées à un important polymorphisme nucléaire, une forte activité mitotique ainsi qu'un aspect de nécrose centrale. Malgré le faible niveau d'expression du CD138 sur les cellules MDA-MB-468 *in vitro*, l'immunomarquage permet de révéler de manière intense la présence de CD138 membranaire. Il a été aussi mis en évidence l'absence d'expression des récepteurs aux oestrogènes, à la progestérone et de HER2 sur cette lignée ce qui lui permet de se développer sans traitement hormonal concomitant et constitue un avantage pour l'expérimentation animale.

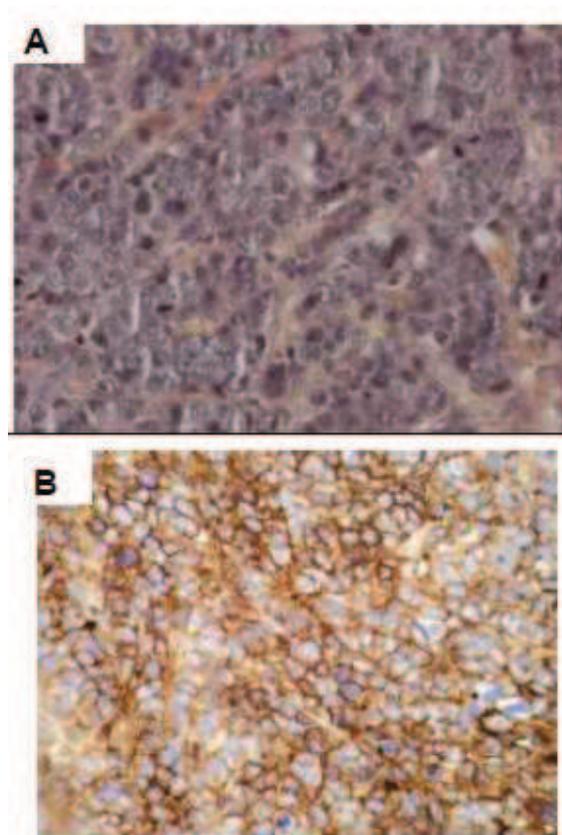
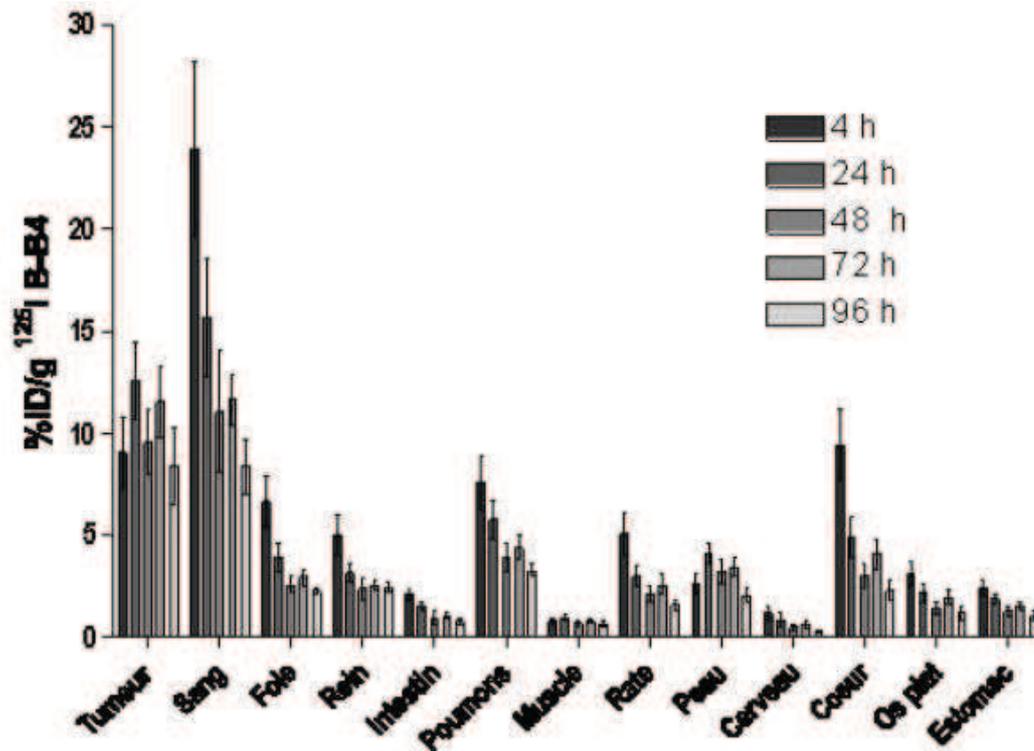


Figure 26 : Etude immunohistochimique du B-B4 sur coupes de tumeurs MDA-MB-468. (A) la coloration à l'hématoxylin-eosin de la lignée cellulaire. (B) la coloration à l'hématoxylin-eosin associée à l'immunomarquage du tissu par le B-B4.

1.3.3. Biodistribution du ^{125}I -B-B4

Après avoir validé la pertinence du modèle, l'étude de la biodistribution du B-B4 au sein des différents organes des souris a été réalisée. La fixation maximale du ^{125}I -B-B4 a été obtenue 24h après l'injection du radioimmunoconjugué ($13,8\% \pm 1,8\%$ ID/g). La fixation est maintenue jusqu'à la fin de l'étude, avec un pourcentage encore relativement élevé à 96h ($8,4\% \pm 1,9\%$ ID/g ; Figure 27).



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

Figure 27 : Etude de la biodistribution du ^{125}I -B-B4, sur des souris *nude* greffées avec 5.10^6 de cellules de la lignée MDA-MB-468 de cancer du sein humain. La fixation du radioimmunoconjugué est représentée par le pourcentage de la dose initiale injectée par gramme (%ID/g), de chaque organe ou tissu prélevé.

L'accumulation maximale au niveau des organes sains a été obtenue à 4h, mais décroît rapidement avec une cinétique similaire à celle du sang.

Les plus fortes fixations sont observées à 4h pour les organes sains les plus vascularisés comme le cœur ($9,42 \pm 3,38\%$ ID/g), les poumons ($7,56 \pm 2,36\%$ ID/g) ou le foie ($6,63 \pm 2,31\%$ ID/g).

Pour déterminer la fixation spécifique et non spécifique du B-B4, il a été réalisé une étude de biodistribution de l'anticorps 7D4, ne reconnaissant pas le syndecan-1 et de même isotype que le B-B4 (IgG1) (Bernardeau et coll., 2005). Les fixations non spécifiques mesurées avec l'anticorps 7D4 ont été soustraites des fixations obtenues avec le B-B4 spécifique du syndecan-1 afin de faire apparaître la fixation spécifique liée à la reconnaissance de l'antigène CD138. Les résultats présentés dans la figure 28 indiquent que tous les organes, excepté la tumeur, fixaient de la même manière l'anticorps spécifique et non spécifique, avec des différences qui n'excèdent pas 1% ID/g ce qui indique une fixation spécifique du B-B4 sur la tumeur.

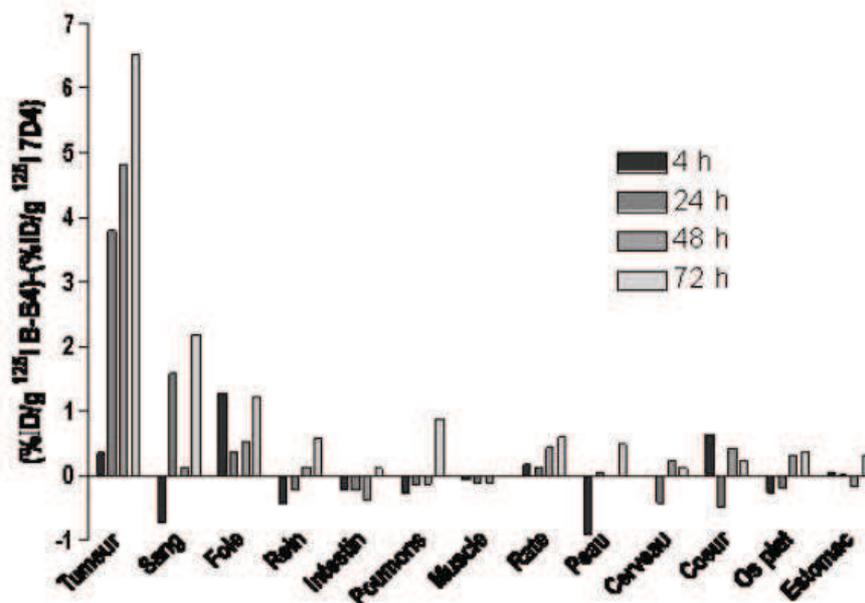
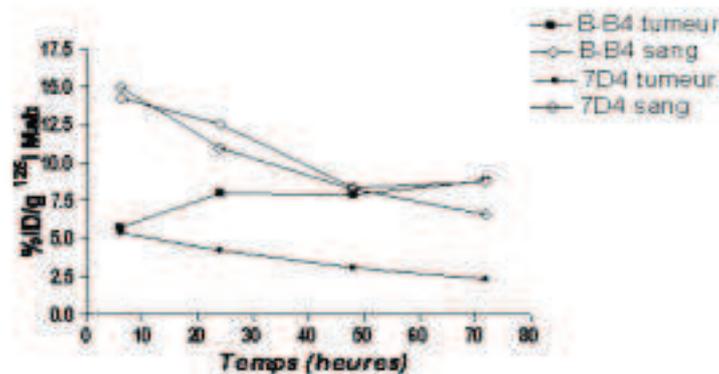
A**B**

Figure 28 : Comparaison de la biodistribution du B-B4 spécifique avec l'anticorps 7D4 non spécifique du syndecan-1. (A) : Représentation de la distribution du ^{125}I -B-B4 à laquelle est soustrait celle du ^{125}I -7D4. (B) : Distribution des ^{125}I -B-B4 et ^{125}I -7D4 au niveau du sang et de la tumeur.

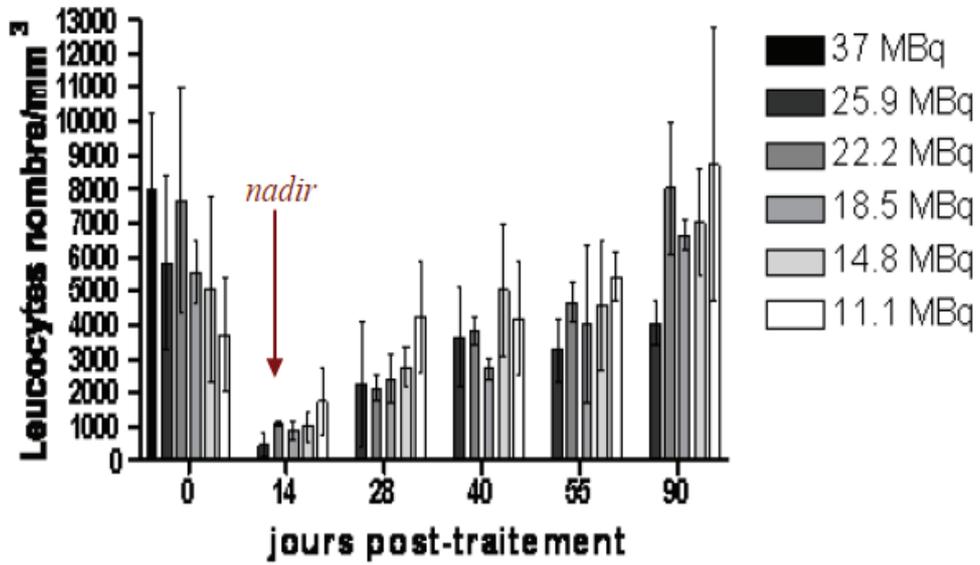
1.3.4. Toxicité et détermination de la DMT

Une escalade d'activités de 11,1 à 37 MBq de ^{131}I -B-B4 avec une incrémentation de 3,7 MBq par palier a été réalisée. Les animaux traités à 37 MBq ont présenté une perte de poids supérieure à 10% pour 2 d'entre eux. L'ensemble des souris à cette même activité est décédé 3 semaines après le traitement. Cela nous indique que l'activité de 37 MBq

était supérieure à la DMT. Parmi les souris du groupe d'activité 25,9 MBq, 2 d'entre elles ont perdu plus de 10% de leur poids initial ce qui correspond à 28% de l'effectif du groupe et une seule souris est décédée soit 14% de l'effectif. Ces résultats ont permis de fixer la DMT au palier 22,2 MBq, en effet, dans ce groupe on a constaté aucun décès ni de perte de poids >10%.

La toxicité hématologique a été déterminée à partir de la numération des plaquettes et des leucocytes. Les résultats sont présentés à la figure 29. Il n'a pas été noté de modification significative dans l'évolution du nombre des hématies, même aux temps tardifs de l'étude.

A



B

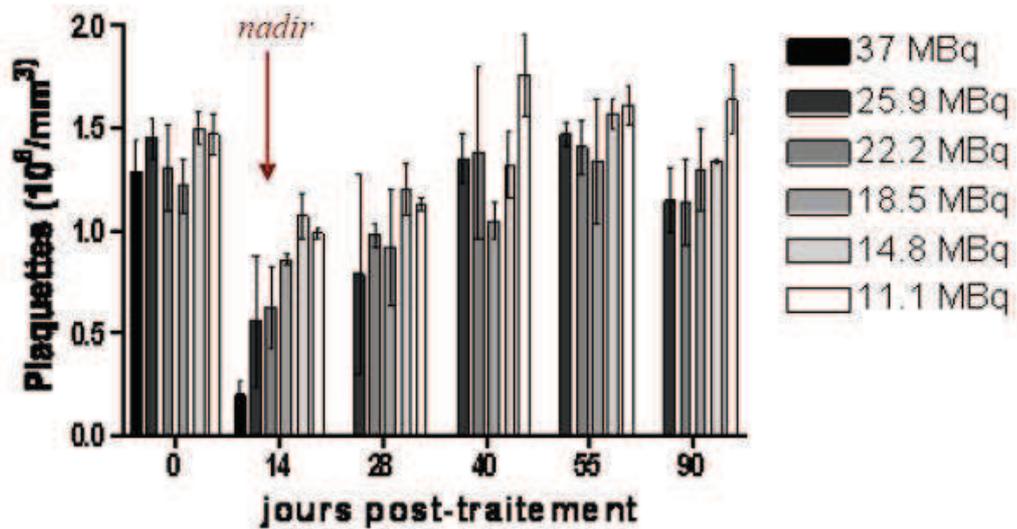


Figure 29 : Toxicité hématologique du ¹³¹I-B-B4. (A) : nombre de leucocytes. (B) : nombre de plaquettes. Toutes les souris traitées par 37 MBq sont mortes après J14.

Le nadir plaquettaire a été déterminé à J14. Une chute du taux plaquettaire dose-dépendante a été observée avec des activités de 11,1 à 25,9 MBq atteignant 67,4% et 38,6% du taux initial de plaquettes. Une chute des plaquettes plus prononcée a été observée avec une activité de 37 MBq : le taux plaquettaire à J14 correspondait à 15% du taux initial ce qui traduisait une toxicité hématologique aiguë à cette activité. L'évolution des leucocytes a été similaire à celle des plaquettes conduisant à un nadir à J14. Les 2 lignées se sont rapidement et spontanément restaurées (J40 pour le taux plaquettaire et J70 pour les leucocytes), excepté pour les animaux du groupe d'activité de 37 MBq où aucune n'a survécu 2 semaines après le début du traitement. Les décès survenus dans les groupes traités à forte activité 37 et 25,9 MBq ont probablement été secondaires à l'aplasie toxique.

I.3.5. Efficacité de la RIT

La DMT ayant été fixée à 22,2 MBq, une étude de RIT avec le ^{131}I -B-B4 a été réalisée à 14,8 et 22,2 MBq, sur des souris *nude*, greffées avec la lignée MDA-MB-468. La figure 30 représente les réponses tumorales de chacun des groupes par rapport au groupe témoin. Une réponse tumorale est observée dans chacun des groupes traités.

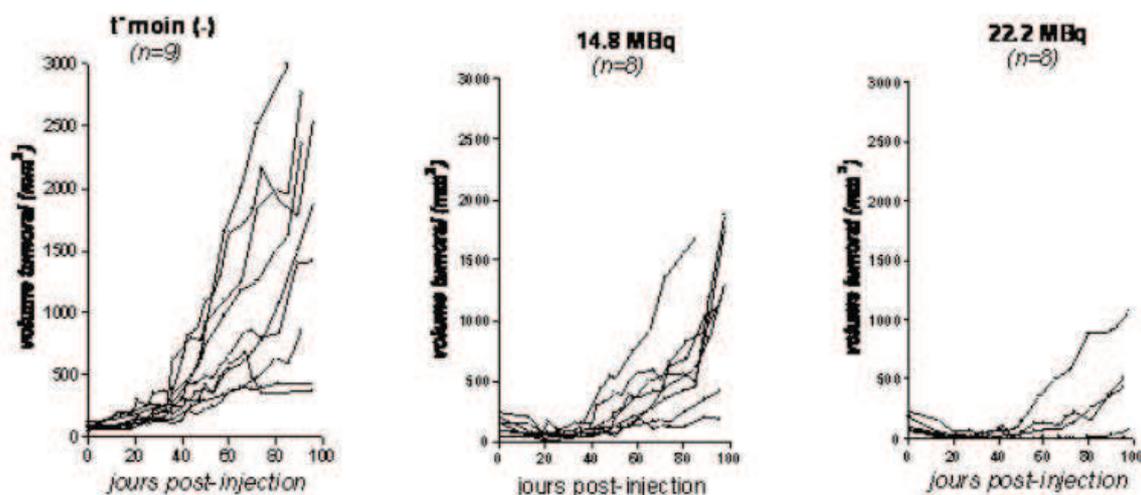


Figure 30 : Evaluation de la réponse tumorale en RIT ^{131}I -B-B4. Deux activités ont été étudiées et comparées à un groupe témoin non traité.

Les administrations du B-B4 non radiomarqué ou de l'anticorps isotype radiomarqué n'ont eu aucun effet sur la croissance tumorale.

L'analyse statistique a révélé une différence significative du volume tumoral moyen entre le groupe traité à 22,2 MBq et le groupe témoin, ainsi qu'entre le groupe traité à 8 MBq et le groupe témoin (figure 31).

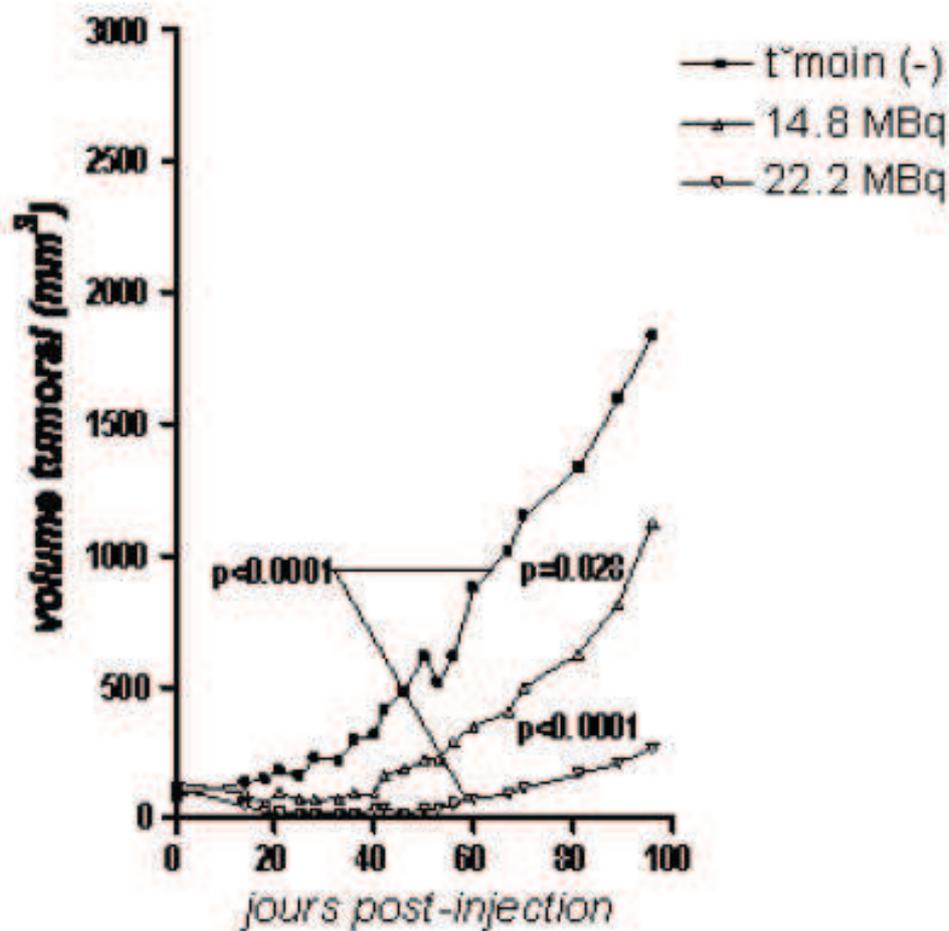


Figure 31 : Etude comparative des volumes tumoraux moyens des différents groupes traités (14,8 et 22,2 MBq ¹³¹I-B-B4) et du groupe témoin.

L'activité correspondant à la DMT (22,2 MBq) a permis la disparition des tumeurs chez 3 animaux soit 37,5% des souris ainsi que l'obtention de 2 réponses complètes et de 3 réponses partielles sur une durée de 48 ± 32 jours. A 14,8 MBq, 37,5% des animaux traités ont répondu partiellement sur une durée de 31 ± 5 jours. Les tumeurs des souris du groupe contrôle ont présenté une croissance continue.

La figure 32 présente le retard de croissance dans les différents groupes : l'efficacité du traitement par $^{131}\text{I-B-B4}$, dépendant de l'activité injectée, semble confirmée par cette étude. Le retard de croissance moyen a été de 28 ± 13 et 58 ± 17 jours pour le groupe témoin et le groupe ayant reçu 14,8 MBq respectivement. De plus, parmi les 8 souris traitées avec 22,2 MBq de $^{131}\text{I-B-B4}$, seulement 3 d'entre elles ont eu, en fin d'étude, un volume tumoral plus important que leur volume mesuré initial. L'activité correspondant à la DMT est donc bien la plus efficace (Ruellan., 2009).

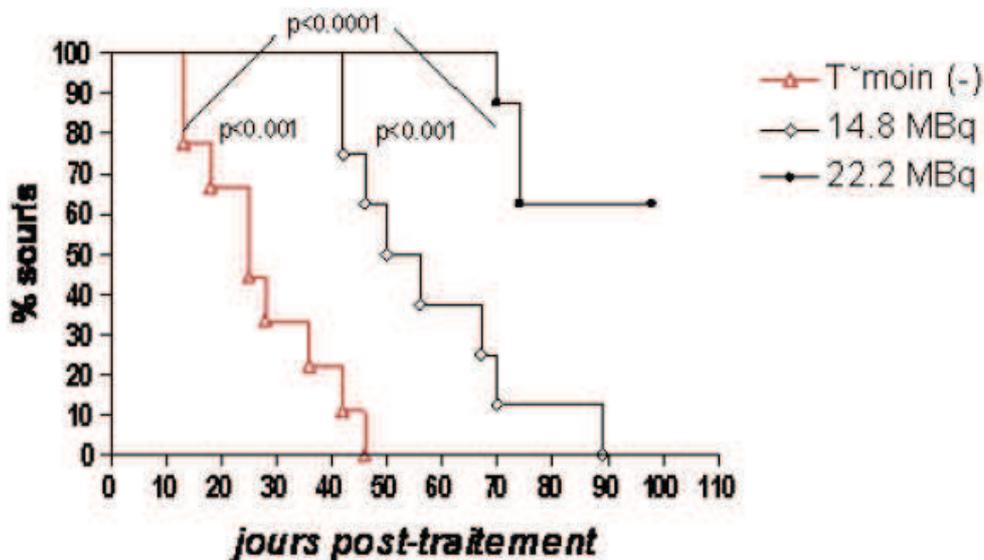


Figure 32 : Etude du temps de doublement des tumeurs traitées en RIT $^{131}\text{I-B-B4}$ aux activités de 14,8 et 22, 2 MBq comparé à un groupe non traité.

I.4. Discussion

Ces dernières années, la RIT administrée par voie systémique a prouvé son efficacité en clinique, en particulier dans les hémopathies malignes et actuellement les radiopharmaceutiques sont utilisés en routine dans ces indications. Quelques résultats encourageants ont été également montrés dans les tumeurs solides plus radio-résistantes, comme le cancer colo-rectal ou le cancer médullaire de la thyroïde, notamment au stade de maladie occulte. Les micro-métastases axillaires du cancer du sein se sont révélées être radiosensibles en radiothérapie externe (DeNardo et coll., 2002). Par conséquent, la maladie résiduelle potentiellement localisée en dehors de cette zone contrôlée par la radiothérapie devrait également être sensible aux rayonnements si elle est traitée avec une dose suffisante.

Le cancer triple négatif, représentant 15% des cancers invasifs du sein et caractérisé par son absence d'expression de ER, PR et Her2, est porteur d'un mauvais pronostic avec un taux de rechutes plus élevé que pour les autres types de cancer du sein. De plus, cette tumeur agressive répond moins bien à la chimiothérapie et pas du tout à l'hormonothérapie qui seraient pourtant nécessaires dans la prise en charge du fait de l'agressivité tumorale. De ce fait, il existe un besoin impératif de développement de thérapies ciblées pour ce type tumoral et la RIT pourrait être une de ces thérapies. Plusieurs cibles antigéniques ont été proposées pour cibler le cancer du sein métastatique mais le statut tumoral particulier du cancer du sein triple négatif fait qu'un ciblage original restait à proposer.

Le choix du syndecan-1 comme un antigène cible de cette radiothérapie a été basé sur le fait qu'une association a été mise en évidence entre l'expression du syndecan-1 et l'absence de récepteurs ER et d'un index de prolifération Ki67 élevé donc une relation avec un phénotype de cancer du sein agressif. Cet antigène dans le cancer du sein peut être exprimé soit à la surface des cellules épithéliales soit dans le stroma ou les deux avec une connotation pronostique péjorative forte même si celle-ci est encore débattue. Les essais cliniques dans le cancer du sein ont montré une corrélation entre l'expression du syndecan-1 et une mauvaise réponse à la chimiothérapie (Yang et coll. 2007 ; Babareschi et coll., 2003 ; Leivonen et coll., 1996). Le choix de la cible syndecan-1 pour une RIT nous a paru pertinent avec un anticorps monoclonal capable de cibler

les deux expressions cellulaires (épithéliale et stromale) du syndecan-1. Le B-B4 est l'AcM murin ciblant le syndecan-1 qui a été choisi et qui a été développé dans le myélome multiple par Wijdenes et coll. (Wijdenes et coll. 1996).

A notre connaissance, c'est la première fois qu'une étude a été menée afin de déterminer la biodistribution et les possibilités thérapeutiques d'un AcM marqué à l'iode 131 dans le contexte du cancer du sein triple négatif.

Notre choix de lignée cellulaire s'est porté sur la lignée MDA-MB-468 qui est représentative du cancer du sein triple négatif de mauvais pronostic. Elle est souvent utilisée pour les xénogreffes chez la souris *nude* pour tester de nouveaux médicaments ainsi que différentes stratégies thérapeutiques dans le cancer du sein. Le test de liaison à l'équilibre a révélé un nombre de sites antigéniques limité à $1,2 \cdot 10^4$ par cellule. Ce faible niveau d'expression du CD138 peut expliquer le relativement faible ratio tumeur/sang constaté lors de la biodistribution du ^{125}I -B-B4 et la DMT relativement élevée (22,2 MBq). Ces deux points méritent d'être discutés. L'étude nous a permis de constater qu'il persistait une concentration élevée d'AcM radiomarké dans la circulation sanguine jusqu'à 96h avec des taux d'AcM comparables dans le sang et la tumeur, ce qui est un avantage pour atteindre des cibles antigéniques peu exprimées comme ici dans le cadre du ciblage de la lignée MDA-MB-468. L'autre point intéressant est de savoir comment se situe la DMT de l'étude par rapport aux autres données de RIT du cancer du sein. D'autres auteurs, chez la souris porteuse d'une xénogreffe de cancer du sein, ont utilisé des anticorps (IgG) radiomarkés à l'iode 131 et ont décrit une DMT variant de 7,4 MBq pour l'AcM 131I-anti-LewisY (hu3S193) à 44,4 MBq pour l'AcM 131I-anti-MUC-1 (MC5) (Clarke et coll., 2000 ; Peterson et coll., 1997). La DMT que nous avons déterminée se trouve dans la gamme de DMT de ces études antérieures.

Comme prévu avec une tumeur maligne sensible aux radiations comme le cancer du sein, nous avons observé une relation dose-effet. L'activité de 14,8 MBq d' ^{131}I -B-B4 a retardé la croissance tumorale de 58 ± 17 jours par rapport au groupe non traité (28 ± 13 jours) et l'activité de 22,2 MBq d' ^{131}I -B-B4 a ralenti la croissance tumorale pour la période entière de l'étude puisque le volume tumoral n'a pas doublé pour la moitié des souris. Le ciblage est donc efficace même pour de faibles densités antigéniques lorsque ce ciblage est réalisé avec un anticorps complet (IgG).

Une étude précédente (Couturier et coll., 1999) a démontré que le B-B4 non radiomarqué n'était pas cytotoxique pour les cellules de myélome. Cela a également été observé dans notre étude: il n'y a pas eu de différence significative entre le groupe B-B4 non radiomarqué, le groupe anticorps isotype radiomarqué et le groupe non traité, de sorte que l'efficacité n'était due ni à une activité biologique de l'anticorps lui-même ni à une irradiation non spécifique.

Les résultats obtenus dans notre étude sont très encourageants avec plus de 60% de réponses complètes et la disparition totale des tumeurs chez 37,5% des animaux traités dans le groupe ayant reçu la DMT et pour un suivi de 3 mois.

Le traitement pour le groupe de la DMT a produit une leucopénie et une baisse modérée des plaquettes avec un retour à des taux normaux spontanément. Pour les autres groupes, la toxicité sur les leucocytes et les plaquettes était acceptable avec une efficacité indéniable sur la croissance tumorale.

Le choix du radionucléide pour la thérapie est fondamentale car peut influencer sur l'efficacité de la RIT. L'iode 131 présente certains avantages, notamment la possibilité de l'imagerie et de la dosimétrie et une faible fixation dans le foie. Il doit y avoir adéquation entre la forme de l'anticorps et la demi-vie du radioélément choisi. Dans notre étude, l'utilisation d'un anticorps complet était bien adaptée à un radioélément à demi-vie relativement longue comme l'iode 131. Toutefois, les anticorps marqués avec des isotopes de l'iode selon la méthode chloramineT classique peuvent subir une perte d'efficacité en raison de l'évacuation rapide de l'iodo-tyrosine hors de la cellule par catabolisme de l'anticorps radioiodé dans le compartiment lysosomal, en particulier en cas d'internalisation des anticorps. Plusieurs auteurs ont déjà signalé que le CD138 était internalisé. Le mécanisme d'internalisation a été décrit comme indépendant de la clathrine, rapide et impliquant un processus avec plusieurs étapes (Wilsie et coll., 2006 ; Fuki et coll., 2000), mais il ne semble pas se produire de dégradation rapide du ligand lors de l'internalisation du CD138. De plus, nos données de biodistribution ont montré peu de diminution de l'activité tumorale jusqu'à 96 h, tandis que la concentration d'anticorps dans la circulation a diminué d'au moins trois fois. Ainsi, la dés-iodation de l'anticorps radiomarqué nous a semblé être limitée et ne permettait pas d'exclure la possibilité d'effectuer de la RIT avec ¹³¹I-B-B4, ce qui a été conforté par les résultats

encourageants de RIT de notre étude obtenus avec une lignée de cancer du sein triple négatif exprimant peu le syndecan-1. Toutefois, il serait intéressant d'envisager d'utiliser d'autres radioéléments tels que le lutétium-177 ou l'yttrium-90 pour augmenter encore l'efficacité de la RIT.

L'étude de biodistribution de l'anticorps 7D4, non spécifique du syndecan-1 mais de même isotype que le B-B4, nous a permis de valider l'accumulation du B-B4 par fixation spécifique de l'anticorps sur le syndecan-1 des cellules tumorales. Cette comparaison nous a permis également d'affirmer que le B-B4 ne se fixait pas sur les organes sains de façon spécifique. Néanmoins dans notre modèle de souris xénogreffées, on peut considérer qu'il s'agit d'un biais puisque le B-B4 utilisé ne reconnaît pas le syndecan-1 murin mais ce biais est inné au modèle xénogénique. L'étude clinique de phase I/II de RIT dans le myélome multiple avec l'¹³¹I-B-B4 nous a permis par dosimétrie d'évaluer la fixation spécifique de cet anticorps aux organes sains (article en annexe). Les moyennes des demi-vies effectives du ¹³¹I-B-B4 au corps entier et dans le sang chez les 4 patients ont été respectivement de 38,3 ± 3 et 30,3 ± 11 heures. La dose absorbée par le foie était de 2,13 mGy / MBq [1,77 à 2,55]. Si l'on extrapolait à une activité thérapeutique de 1 GBq, une dose d'irradiation moyenne de 2 Gy pouvait être prédite. L'irradiation des reins est restée modérée avec une dose absorbée de 0,72 mGy / MBq [0,66 à 2,48]. Le patient qui a présenté la plus forte dose absorbée aux reins (3 fois plus élevée) n'a pas présenté de modifications significatives de la fonction rénale au cours du suivi. Les doses absorbées à la rate et aux poumons étaient faibles; environ 0,5 Gy pour une dose thérapeutique extrapolée à 1 GBq. En outre, l'étude de dosimétrie ne prévoyait pas de limitation à cause des doses absorbées aux organes normaux, même dans le foie, en dépit de la fixation apparente élevée observée par immunoscintigraphie.

I.5. Article

ORIGINAL RESEARCH

Open Access

Syndecan-1 antigen, a promising new target for triple-negative breast cancer immuno-PET and radioimmunotherapy. A preclinical study on MDA-MB-468 xenograft tumors

Caroline Rousseau^{1,2†}, Anne Lise Ruellan^{2†}, Karine Bernardeau², Françoise Kraeber-Bodéré^{1,2,3}, Sebastien Gouard², Delphine Loussouarn⁴, Catherine Sai-Maurel², Alain Faivre-Chauvet², John Wijdenes⁵, Jacques Barbet², Joëlle Gaschet², Michel Chérel^{1,2} and François Davodeau^{2*}

Abstract

Background: Overexpression of syndecan-1 (CD138) in breast carcinoma correlates with a poor prognosis and an aggressive phenotype. The objective of this study was to evaluate the potential of targeting CD138 by immuno-PET imaging and radioimmunotherapy (RIT) using the antihuman syndecan-1 B-B4 mAb radiolabeled with either ¹²⁴I or ¹³¹I in nude mice engrafted with the triple-negative MDA-MB-468 breast cancer cell line.

Method: The immunoreactivity of ¹²⁵I-B-B4 (80%) was determined, and the affinity of ¹²⁵I-B-B4 and the expression of CD138 on MDA-MB-468 was measured *in vitro* by Scatchard analysis. CD138 expression on established tumors was confirmed by immunohistochemistry. A biodistribution study was performed in mice with subcutaneous MDA-MB-468 and ¹²⁵I-B-B4 at 4, 24, 48, 72, and 96 h after injection and compared with an isotope-matched control. Tumor uptake of B-B4 was evaluated *in vivo* by immuno-PET imaging using the ¹²⁴I-B-B4 mAb. The maximum tolerated dose (MTD) was determined from mice treated with ¹³¹I-B-B4 and the RIT efficacy evaluated.

Results: ¹²⁵I-B-B4 affinity was in the nanomolar range (Kd = 4.39 ± 1.10 nM). CD138 expression on MDA-MB-468 cells was quite low (Bmax = 1.19 × 10⁴ ± 9.27 × 10² epitopes/cell) but all expressed CD138 *in vivo* as determined by immunohistochemistry. The tumor uptake of ¹²⁵I-B-B4 peaked at 14% injected dose (ID) per gram at 24 h and was higher than that of the isotope-matched control mAb (5% ID per gram at 24 h). Immuno-PET performed with ¹²⁴I-B-B4 on tumor-bearing mice confirmed the specificity of B-B4 uptake and its retention within the tumor. The MTD was reached at 22.2 MBq. All mice treated with RIT (n = 8) as a single treatment at the MTD experienced a partial (n = 3) or complete (n = 5) response, with three of them remaining tumor-free 95 days after treatment.

Conclusion: These results demonstrate that RIT with ¹³¹I-B-B4 could be considered for the treatment of metastatic triple-negative breast cancer that cannot benefit from hormone therapy or anti-Her2/neu immunotherapy. Immuno-PET for visualizing CD138-expressing tumors with ¹²⁴I-B-B4 reinforces the interest of this mAb for diagnosis and quantitative imaging.

Keywords: breast cancer, syndecan-1, CD138, radioimmunotherapy, immuno-PET, monoclonal antibody

* Correspondence: davodeau@nantes.inserm.fr

† Contributed equally

²Centre de Recherche en Cancérologie de Nantes-Angers, Université de Nantes, Inserm, U892, Nantes, France

Full list of author information is available at the end of the article

Background

The expression of syndecan-1 in breast cancer is described as a poor prognostic factor. However, the potential of targeting this antigen for immuno-PET or radioimmunotherapy has not yet been investigated. Syndecans represent a four-member family of transmembrane cell-surface heparan sulfate proteoglycans. Their biological effects on adhesion, migration, and growth factor signaling are thought to be mediated by their binding to growth factors, including FGFs, VEGF, HGF, or ECM molecules, via their HS chains [1-3]. Syndecan-1, also named CD138, is expressed by normal epithelial cells but is also transiently expressed in condensing mesenchyma during embryonic morphogenesis [4]. The biological functions of syndecan-1 potentially affect several steps in tumor progression and facilitate metastasis [5]. A prognostic value has been assigned to changes in syndecan-1 expression in several cancer types, including breast, colorectal, gastric, pancreatic, prostate, lung, endometrial, and ovarian cancers, as well as squamous cell carcinoma of the head and neck and multiple myeloma [6,7]. Syndecan-1 appears particularly interesting for breast carcinoma radioimmunotherapy (RIT). The antigen is expressed by potentially aggressive breast carcinomas, and its expression is tightly associated with the absence of estrogen receptors (ER) as well as with a high Ki67 proliferation index [8]. Triple-negative (ER-negative, progesterone receptor (PR)-negative, HER2/neu not overexpressed) breast cancer (TNBC) represents approximately 15% of all breast carcinomas [9]. It generally occurs in women below the age of 50 years and is associated with a high risk of distant recurrence and death during the first 3 to 5 years of follow-up [10]. Cytotoxic chemotherapy is currently the only treatment available for TNBC patients, but most of them have chemoresistant rampant disease with a poor prognosis. However, novel targeted therapies have the potential to change its natural course [11]. Monoclonal antibody therapy is one such targeted therapy that may prove beneficial in the management of these breast cancer subtypes [9,12].

B-B4 is a murine IgG1 mAb targeting syndecan-1 that was originally developed for multiple myeloma by Wijdenes and colleagues [13]. The B-B4 mAb has been shown to have high specificity for syndecan-1, but it is not cytotoxic for myeloma cells [14]. Subsequently, one study reported that ^{131}I -labeled B-B4 mAb induced cellular death in an *in vitro* multiple myeloma model [15].

Several radioimmunotherapy clinical trials have been performed for breast cancer treatment targeting Tag 72, mucin, CEA, and an adenocarcinoma antigen recognized by the ChL6 antibody [16-19]. However, objective tumor responses were obtained with limited toxicity compared to standard chemotherapy treatment of patients at the

same disease stage. Repeated dosing with radiolabeled antibody or combination of RIT with other therapeutic agents might further improve RIT efficacy.

To date, there has been no study investigating the diagnostic and therapeutic potential of radiolabeled B-B4 mAb in breast carcinoma, particularly in TNBC cells such as the MDA-MB-468 cell line that shows many of the recurrent basal-like molecular abnormalities [20]. The aim of this study was thus to evaluate the biodistribution, toxicity, and RIT efficacy of the radioiodinated anti-CD138 antibody B-B4 in mice xenografted with the MDA-MB-468 TNBC cell line.

Methods

Cell line

The human TNBC cell line MDA-MB-468 was obtained from LGC Promochem (Molsheim, France). The MDA-MB-468 cell line was cultured in adherent-cell monolayers in RPMI medium (Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% bovine calf serum (Gibco BRL), 1% glutamine (L-glutamine 200 mM; Gibco BRL), and 1% antibiotic (penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 U/ml; Gibco BRL). The human myeloma cell line U266 used for the radiolabeled B-B4 immunoreactivity assay was obtained from the American Type Culture collection (Rockville, MD, USA).

Animal model

NMRI-nu (nu/nu) mice over 8 to 10 weeks of age were grafted subcutaneously in the right flank with 5×10^6 MDA-MB-468 cells in 0.1 mL of PBS. The animals were housed in aseptic conditions. Lugol's 1% solution was added to drinking water (0.1 mL/L) 2 days before RIT and then 2 weeks after injecting the radioiodinated reagent. The mice were injected with radiolabeled mAb 24 days after MDA-MB-468 engraftment once the tumor volume had reached a mean volume of $108 \pm 55 \text{ mm}^3$. The mice were housed in our animal core facility according to ongoing national regulations issued by INSERM and the French Department of Agriculture. The experiments performed in this study were approved by the local veterinary services (license number B44.565).

Antibodies and radiolabeling

The reference antibody was the B-B4 anti-CD138 mAb (IgG1). This mouse IgG1 was kindly provided by Diaclone (Besançon, France). The 7D4 mAb was used as the isotype-matched control in the biodistribution studies [21]. This mAb recognizes the CMH-peptide complex formed by peptide MAGE3 271-279 and HLA-A2. This epitope is not expressed on MDA-MB-468 cells. The antibodies were labeled with ^{125}I (PerkinElmer 16, Avenue du Québec, Courtaboeuf Cedex 1, France) using the

iodogen method [22]. The ^{125}I -labeled mAb was purified on a PD10 column. The B-B4 mAb was also labeled with ^{131}I (MDS Nordion, Zoning Industriel, Avenue de L'Espérance, Fleurus, Belgium) using the same iodogen method. The specific activity ranged from 185 to 200 MBq/mg. Radiolabeling efficiency estimated by instant thin-layer chromatography (ITLC) was above 95%. The ^{131}I -labeled antibody was not purified further. Iodine- 124 (IBA molecular, Chemin du cyclotron, 3, Louvain-la-Neuve, Belgium)

labeling of the B-B4 mAb for immuno-PET imaging was performed according to a previously described method [22]. Briefly, 1.7 mg (350 μL) B-B4 in 0.1 M phosphate buffer pH 7 and 20 μL (0.1 mg) of iodogen in DMF were added to a glass vial containing 230 μL (222 MBq) of Na^{124}I . After 15 min of incubation under gentle mixing at room temperature, the radiolabeled antibody was purified by gel filtration on NAPTM-5 columns (GE Healthcare UK, Little Chalfont Buckinghamshire, UK). The ^{124}I -B-B4 was recovered in 1.15 ml. The specific activity was 90 mBq/mg, and the radiochemical purity of the purified radiolabeled antibody was greater than 98% as determined by ITLC-SG chromatography using trichloroacetic acid at 10% *w/v* in distilled water as a mobile phase.

Immunoreactivity and affinity

The immunoreactivity of radiolabeled B-B4 was determined according to the "Lindmo" cell-binding assay using CD138-positive U266 cells [23]. The number of antigen-binding sites per MDA-MB-468 cells was determined by Scatchard analysis as previously described [21]. The binding data were subjected to nonlinear regression analysis using a one-site equilibrium binding equation with Prism software.

Immunohistochemistry

Tumor sections (4 μm) were cut from the tissue microarray blocks and placed on superfrost slides. The immunohistochemical technique was performed with an automated immuno-stainer (Labvision, Fremont, CA, USA) using the streptavidin-biotin amplification technique (ChemMate kit, Dako, Glostrup, Denmark) after appropriate antigen retrieval in EDTA buffer (pH 8) at 95°C. This involved the application of a specific primary antibody to syndecan-1/CD138 (clone MI15, 1:100, Dako). A secondary anti-mouse antibody conjugated to peroxidase was used for revelation. Peroxidase activity was revealed using 3,3'-diamino-benzidine for 5 min. Sections were counterstained with Harris hematoxylin for 3 min. Negative controls were obtained by omitting primary antibodies.

Biodistribution

MDA-MB-468 tumor-bearing mice were given 4 MBq of ^{125}I -labeled B-B4 (5 μg) via the tail vein. The mice were

killed 4, 24, 48, 72, and 96 h after injection (three mice per time point), the tumor and organs were removed, weighed, and the radioactivity counted using a gamma counter. The results were expressed as percent ID per gram. The same protocol was applied for biodistribution of the control isotype-matched 7D4 mAb.

PET imaging

Immuno-PET imaging with ^{124}I -labeled B-B4 was performed on six NMRI-nu (nu/nu) mice bearing MDA-MB-468 xenografts. An activity of 3.3 MBq of ^{124}I -labeled B-B4 (90 μg) was injected intravenously, and PET images were acquired 1, 2, 3, 4, and 8 days after injection, with an Inveon PET scanner (Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN, USA) under anesthesia (isoflurane-O₂). A CT scan was performed using the docked CT module (Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN, USA).

PET imaging with ^{18}F FDG was performed on three NMRI-nu (nu/nu) mice bearing MDA-MB-468 xenografts receiving an intravenous injection of 6.2 MBq of ^{18}F FDG. PET images were acquired 1 h after injection. PET data were collected over a period of 20 min (one bed position), and the 3D sinograms were reconstructed using a 3D ordered subset expectation maximization followed by a maximum a posteriori algorithm (3D OSEM-MAP).

Dose escalation and toxicity of ^{131}I -labeled B-B4

The mice were injected i.v. in the lateral tail vein with escalating activity of ^{131}I -labeled B-B4 mAb. The amount of B-B4 mAb was adjusted to 120 μg by adding unlabeled B-B4 antibody and the injected doses were adjusted to a constant volume of 0.2 ml with sterile PBS. These groups received 0.0 MBq ($n = 4$), 11.1 MBq ($n = 4$), 14.8 MBq ($n = 4$), 18.5 MBq ($n = 4$), 22.2 MBq ($n = 4$), or 25.9 MBq ($n = 4$) of ^{131}I -labeled B-B4 mAb. This assay was repeated under the same experimental conditions with 25.9 ($n = 3$) and 37 MBq ($n = 3$). The maximum tolerated dose (MTD) was determined using the data obtained in the two assays as the dose just below the one at which at least one mouse died or lost more than 10% of its weight before treatment. The mice were weighed weekly for 96 days, and blood samples were taken from the inner border of the eye at 0, 14, 28, 40, 55, and 90 days after ^{131}I -labeled B-B4 mAb injection. Leukocyte and platelet numbers were determined using a cell counter (Melet-Schloesing Laboratories, Cergy-Pontoise France).

Radioimmunotherapy

An additional RIT experiment was performed under the same conditions as those described for the dose escalation at the MTD (22.2 MBq) ($n = 4$) and at a lower dose of 14.8 MBq ($n = 4$) compared to the control group ($n = 5$). Tumor volumes were measured with a sliding caliper twice a week for 96 days measuring tumor length (L),

width (w) and thickness (t). Tumor volume (V) was calculated according to the formula: $V = \pi/6 \times L \times w \times t$. In order to increase statistical power, the results of tumor growth assessed by this assay were pooled with those of the corresponding mice groups receiving the same doses in the dose escalation assay. The effect of unlabeled B-B4 mAb (120 μg) and the ^{131}I -labeled isotype-matched mAb control was tested in comparison with a PBS control group in an independent assay.

The parameters used to evaluate the efficacy of each type of treatment were the minimal relative volume (the ratio of the smallest measured tumor volume to the initial tumor volume before treatment) and the event defined as the growth delay (the time required for the tumor to double in size after measurement on the day of treatment). The mean tumor volume was calculated for each group on each day of measurement. Tumor responses were categorized as follows: cure (tumor disappeared with no recurrence at the end of the study 96 days later), complete response (CR) (tumor disappeared for at least 7 days but later re-grew), partial response (PR) (tumor volume decreased by 50% or more for at least 7 days but then re-grew).

Statistical analysis

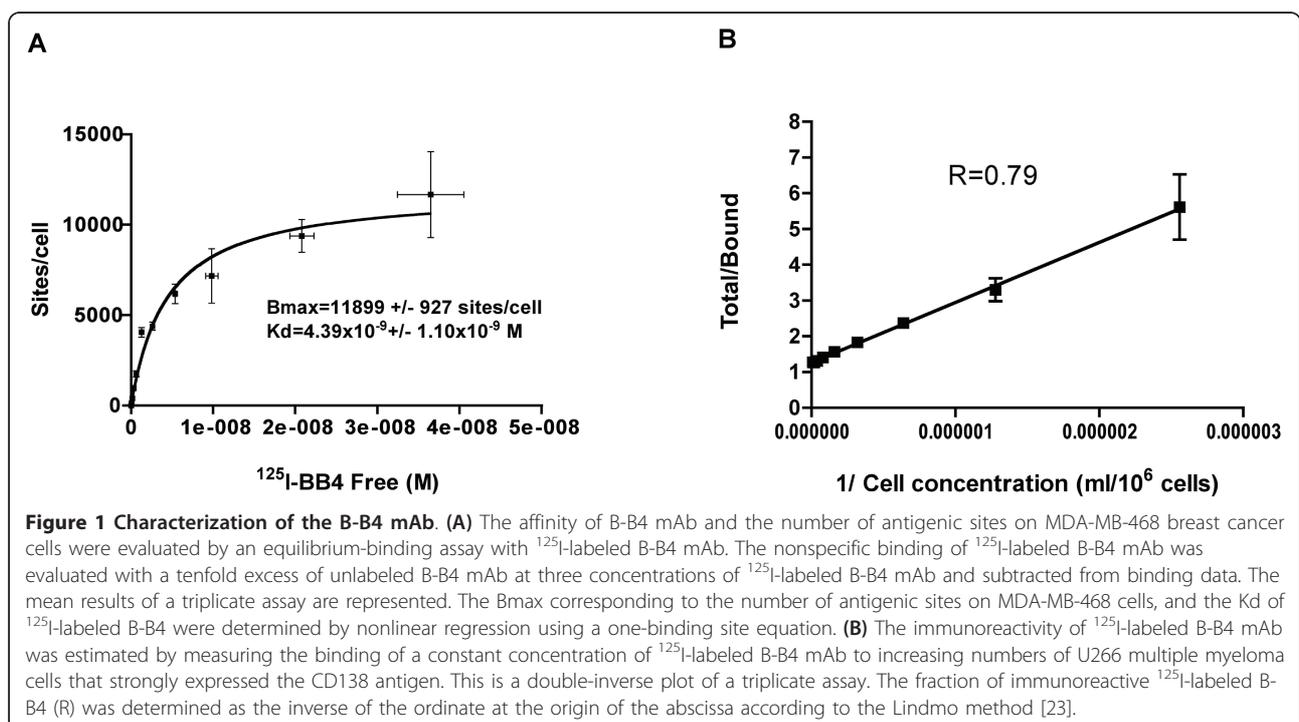
Correlations between dose and degree of toxicity (body weight loss, platelets, leukocytes) or efficacy (tumor growth) were made using the nonparametric Spearman's test. Groups of interest (radioimmunotherapy doses) were

also compared using the nonparametric ANOVA with Bonferroni correction. Curves for event-free survival (the time required for tumors to reach at least twice the initial volume) were calculated according to the Kaplan-Meier method and compared using the Log-rank test. All analyses were two-sided. P values < 0.05 were considered significant. Analyses were performed using SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA) and Stata 10.0 SE (StataCorp, College Station, TX, USA). The comparison of the mean tumor volume curves was performed using a nonparametric test with an on-line software from UCL Institut de Statistique (Louvain, Belgium) <http://www.stat.ucl.ac.be/ISpersonnel/lecoutre/Tgca/french/help/help.htm>.

Results

Immunoreactivity and affinity of radiolabeled B-B4 mAb

CD138 expression was studied upon equilibrium binding of the specific B-B4 antibody to the human breast cancer MDA-MB-468 cell line. The expression of CD138 on this cell line was rather low; only $1.19 \times 10^4 \pm 9.27 \times 10^2$ CD138 sites per cell were detected with saturating amounts of B-B4 mAb (Figure 1A). This result is consistent with previous work indicating that MDA-MB-468 is among the lowest syndecan-expressing breast cancer cell lines [24]. The affinity (dissociation constant) of B-B4 mAb was 4.39 ± 1.10 nM. The immunoreactivity assessed using the method described by Lindmo [23] (Figure 1B) was close to 80%, showing that the labeling did not modify the binding of B-B4 mAb to the CD138 antigen. For



convenience, the immunoreactivity assay was performed on the multiple myeloma cell line U266 that expresses at least ten times more CD138 antigen than MDA-MB-468 cells.

Immunohistochemistry

Syndecan-1 expression was further investigated by immunohistochemistry on xenograft tumors in order to validate the preclinical model for CD138 targeting. The lack of estrogen or progesterone receptor and Her2/neu expression on the MDA-MB-468 cell line was consistent with the capacity of this cell line to form tumors in nude mice without additional hormone treatment. Figure 2 presents micrographs of an MDA-MB-468 xenograft with hematoxylin-eosin staining (panel A) and CD138 immunostaining (panel B). The trabeculae of carcinoma cells were observed with high nuclear pleomorphism, high mitotic activity, and a central necrosis. Despite the relatively low expression of CD138 on cultured MDA-MB-468 cells, intense membrane immunostaining of carcinoma cells

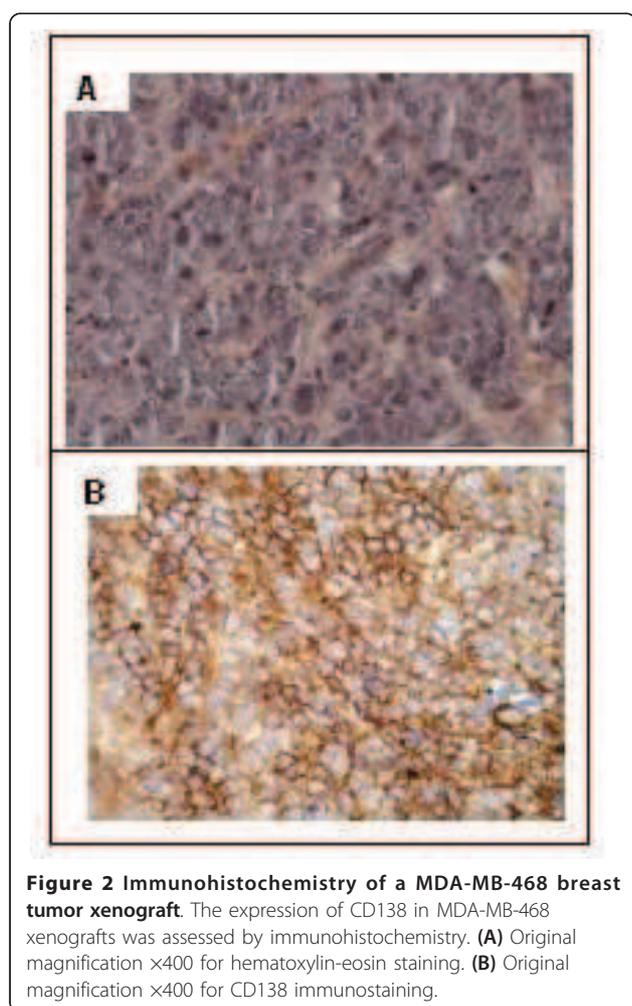


Figure 2 Immunohistochemistry of a MDA-MB-468 breast tumor xenograft. The expression of CD138 in MDA-MB-468 xenografts was assessed by immunohistochemistry. **(A)** Original magnification $\times 400$ for hematoxylin-eosin staining. **(B)** Original magnification $\times 400$ for CD138 immunostaining.

from tumor xenografts was visualized by CD138 immunostaining with the B-B4 mAb.

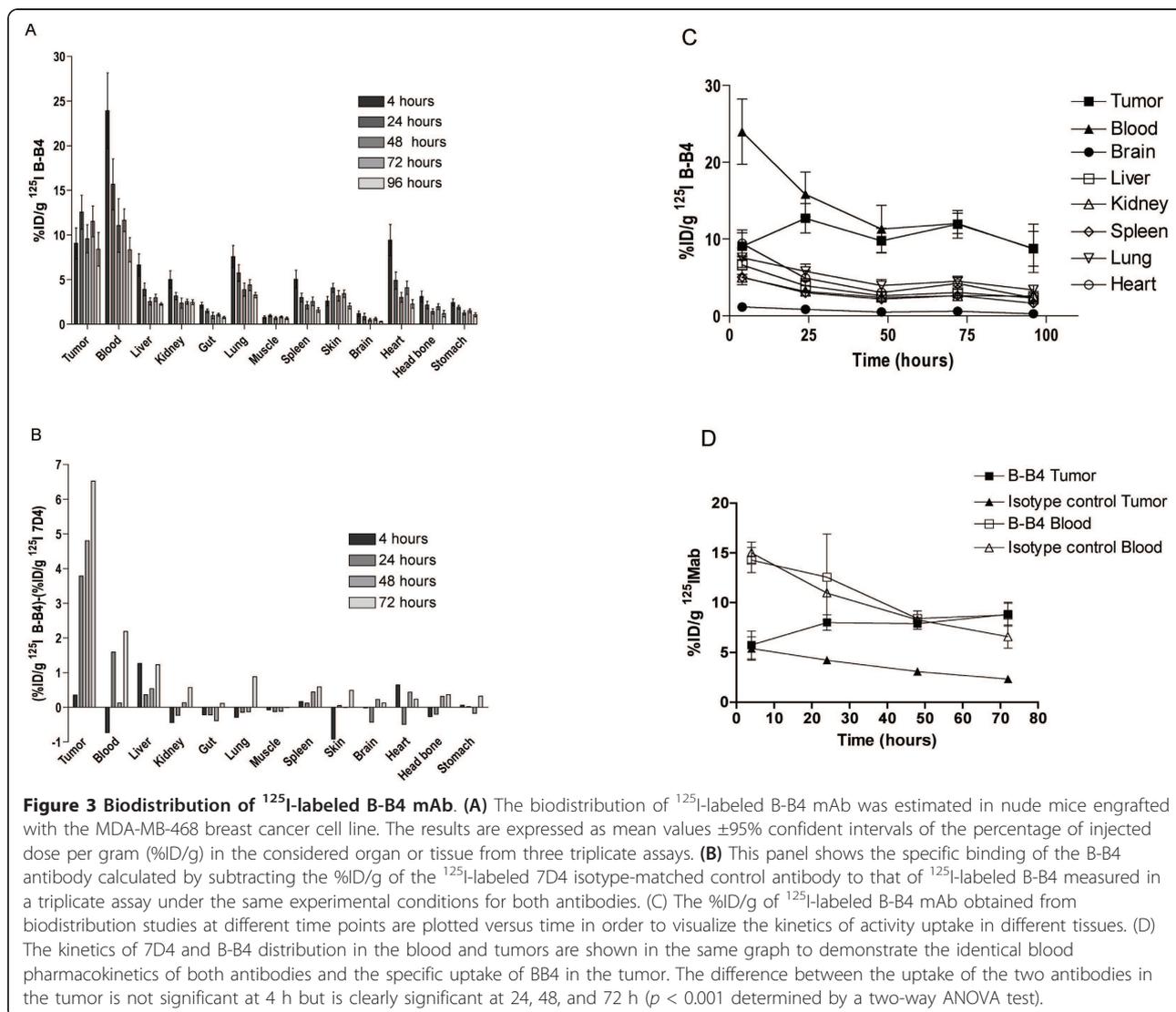
Biodistribution of ^{125}I -labeled B-B4 mAb

In mice injected with ^{125}I -labeled B-B4 mAb, maximum tumor uptake was reached at 24 h ($13.8\% \pm 1.8\%$ ID per gram) and was maintained over time with a tumor uptake of $8.4\% \pm 1.9\%$ ID per gram at 96 h (Figure 3A). In normal tissues, the maximum accumulation was observed at 4 h but rapidly decreased with kinetics similar to those for blood (Figure 3C). A higher level of ^{125}I -labeled B-B4 mAb was observed in the more vascularized organs such as the heart and lungs, in keeping with their higher blood content. The level of ^{125}I -labeled B-B4 mAb in the blood reflected the serum stability of radiolabeled B-B4 mAb.

We further investigated the specificity of B-B4 mAb tumor uptake by comparing it with the biodistribution of an isotype-matched control antibody. To this end, we used the 7D4 IgG1 antibody developed in our laboratory, which does not bind to MDA-MB-468 cells. Tumor uptake measured with the nonspecific 7D4 mAb was subtracted from that detected with the B-B4 mAb in the same assay. The results presented in Figure 3B clearly show that all organs except the tumor displayed an identical B-B4 and 7D4 mAb uptake, with differences that did not exceed 1% ID per gram. Conversely, a clear and specific binding of ^{125}I -labeled B-B4 mAb was observed in the tumor. This specific ^{125}I -labeled B-B4 mAb uptake increased rapidly on the first day post injection and at a lower rate up to 72 h thereafter (Figure 3D). The tumor uptake was long lasting since 7 days after injection, it reached at least 80% of the maximum measured at 72 h (data not shown). Nevertheless, B-B4 tumor uptake was relatively low as compared to other tumor-specific antibodies. Consequently, in this MDA-MB-468 tumor model, the tumor/blood ratio is almost 1:1, as compared to 2:1 in other models. These observations can be explained by the low CD138 expression by this breast cancer cell line, together with the central necrosis in the tumors at the time of the biodistribution study.

Immuno-PET imaging

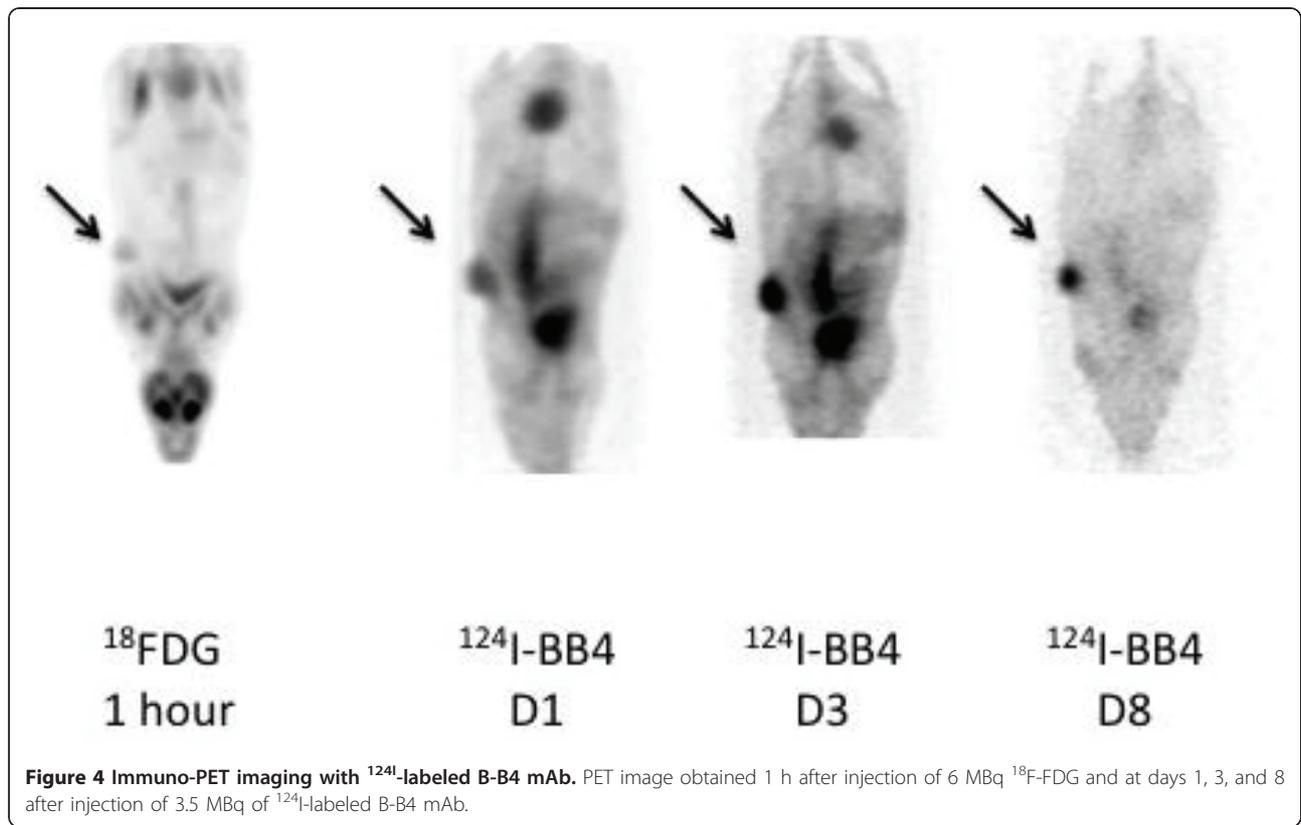
The availability of isotopes of the same element, such as ^{124}I and ^{131}I or ^{86}Y and ^{90}Y , offers the possibility to image tumors by immuno-PET with the antibody used for therapy with identical labeling technology and, therefore, the same pharmacokinetics. This should afford more accuracy in dosimetry calculations before therapy and in providing information on tumor antigen expression complementary to metabolic ^{18}F FDG-PET imaging. We thus used the B-B4 mAb labeled with ^{124}I for immuno-PET imaging in mice engrafted with MDA-MB-468 cells. Imaging was performed on days 1, 3, and 8 for mice injected with 3.5 MBq ^{124}I -labeled B-B4 mAb



or 1 h after ¹⁸F-DG injection. Tumor imaging with ¹²⁴I-labeled B-B4 was as informative as ¹⁸F-DG for tumor visualization, even 1 day after antibody injection (Figure 4). Immuno-PET images recapitulated the results of biodistribution at all times, with a clear tumor imaging at day 1 together with an intense activity in the heart and blood vessels. At day 3, when antibody tumor uptake had reached its maximum, the staining was intense and comparable with that of the heart, which is in accordance with the equal uptake of the antibody in the blood and tumor observed at 72 h in the biodistribution study. Finally, at day 8, the persistence of the labeled antibody within the tumor, together with the decline in blood content, led to a well-contrasted image of the tumor with little signal remaining in normal tissues. This imaging assay validates the feasibility of syndecan-1 targeting for immuno-PET imaging with the B-B4 mAb.

RIT toxicity and MTD

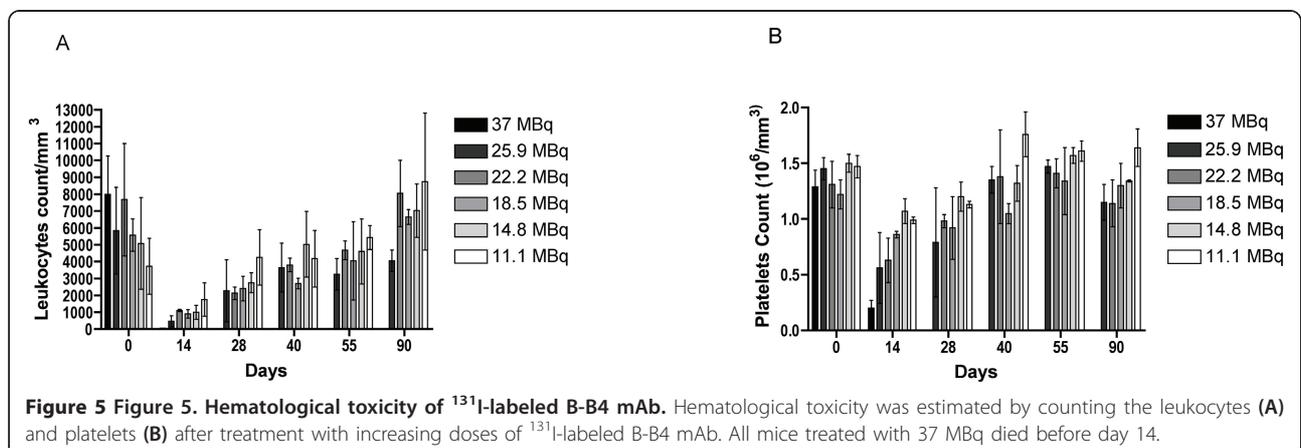
We performed a dose escalation study from 11.1 to 37 MBq with a 3.7-MBq increment of ¹³¹I-labeled B-B4 mAb. Hematological toxicity was assessed by platelet and leukocyte numeration (Figure 5). For platelets, the nadir was observed at day 14. A dose-dependent drop in platelet count was observed from 11.1 to 25.9 MBq reaching respectively 67.4% and 38.6% of the platelet number before treatment ($0.56 \times 10^6/\text{mm}^3$ vs. $1.45 \times 10^6/\text{mm}^3$ and $0.99 \times 10^6/\text{mm}^3$ vs. $1.47 \times 10^6/\text{mm}^3$, respectively). A more dramatic drop was observed at 37 MBq where the platelet count at day 14 decreased to 15% of the pre-treatment value, arguing for an acute hematological toxicity at this injected activity. The platelet count reverted to normal by day 40 at injected activities ranging from 11.1 to 25.9 MBq. The evolution of leukocyte count over time was similar to that of platelets, with a nadir at



14 days. The leukocyte count at injected activities ranging from 14.8 to 25.9 MBq decreased respectively to 19.7% and 7.9% of the pretreatment value (1,000 vs. 5,075/mm³ and 460 vs. 5,847/mm³, respectively). An injected activity of 11.1 MBq was less toxic with a leukocyte count of 47.0% at day 14 and a rapid recovery of normal counts as early as 26 days after treatment. With the exception of the 37 MBq group in which all mice died, a progressive recovery in leukocyte number occurred after the nadir and a normal count was reached 70 days after injection of ^{131}I -labeled B-B4 mAb. In

summary, activities ranging from 11.1 to 25.9 MBq induced a dose-dependent hematological toxicity that spontaneously resolved in 40 days for platelets and 70 days for leukocytes. An injected activity of 37 MBq was clearly toxic.

The monitoring of animal survival and weight confirmed the mild toxicity of injected activities ranging from 11.1 to 22.2 MBq with no weight loss above 10% and no mortality during the follow-up period. Conversely, higher doses were toxic, with weight loss above 10% and death of all mice within 3 weeks of injection of



37 MBq ^{131}I -labeled B-B4 mAb. In the 25.9-MBq group, one mouse out of seven died during the follow-up and two mice lost more than 10% of their initial weight. Therefore, we defined the 22.2-MBq injected activity of ^{131}I -labeled B-B4 mAb as the MTD.

RIT efficacy

The RIT assay was performed 24 days after engraftment of five million MDA-MB-468 cells when well-established tumors of a mean volume of $108 \pm 55 \text{ mm}^3$ were obtained. The mice were treated with 22.2 or 14.8 MBq with a constant molar amount of B-B4. A clear tumor response was observed for the group of mice treated with 14.8 and 22.2 MBq of ^{131}I -labeled B-B4 mAb, as compared to the control group (Figure 6A). Unlabeled B-B4 had no effect on tumor growth when used at the same molar dose as the ^{131}I -labeled B-B4 mAb in the RIT assay. Equivalent activities of a nonspecific antibody were also tested but

without a tumor response (Figure 6B). Despite individual variations in tumor growth within each group, the statistical analysis revealed a very significant difference in mean tumor volumes between control and 22.2-MBq-treated animals on the one hand and between 14.8- and 22.2-MBq-treated animals on the other hand ($p < 0.0001$). A significant difference between control and 14.8-MBq-treated animals ($p = 0.028$) was also observed, confirming the efficacy of ^{131}I -labeled B-B4 mAb RIT (Figure 6A). In the group of eight mice that received 22.2 MBq ^{131}I -labeled B-B4 mAb, five achieved a CR and three a PR (duration of 48 ± 32 days), and three mice were cured at the end of the assay. For the group of mice injected with 14.8 MBq of ^{131}I -labeled B-B4 mAb, three out of eight treated mice achieved PR (duration of 31 ± 5 days), and all the mice had a tumor volume reduction within the 20 days following treatment, whereas tumor growth was continuous in the control group. We further analyzed the

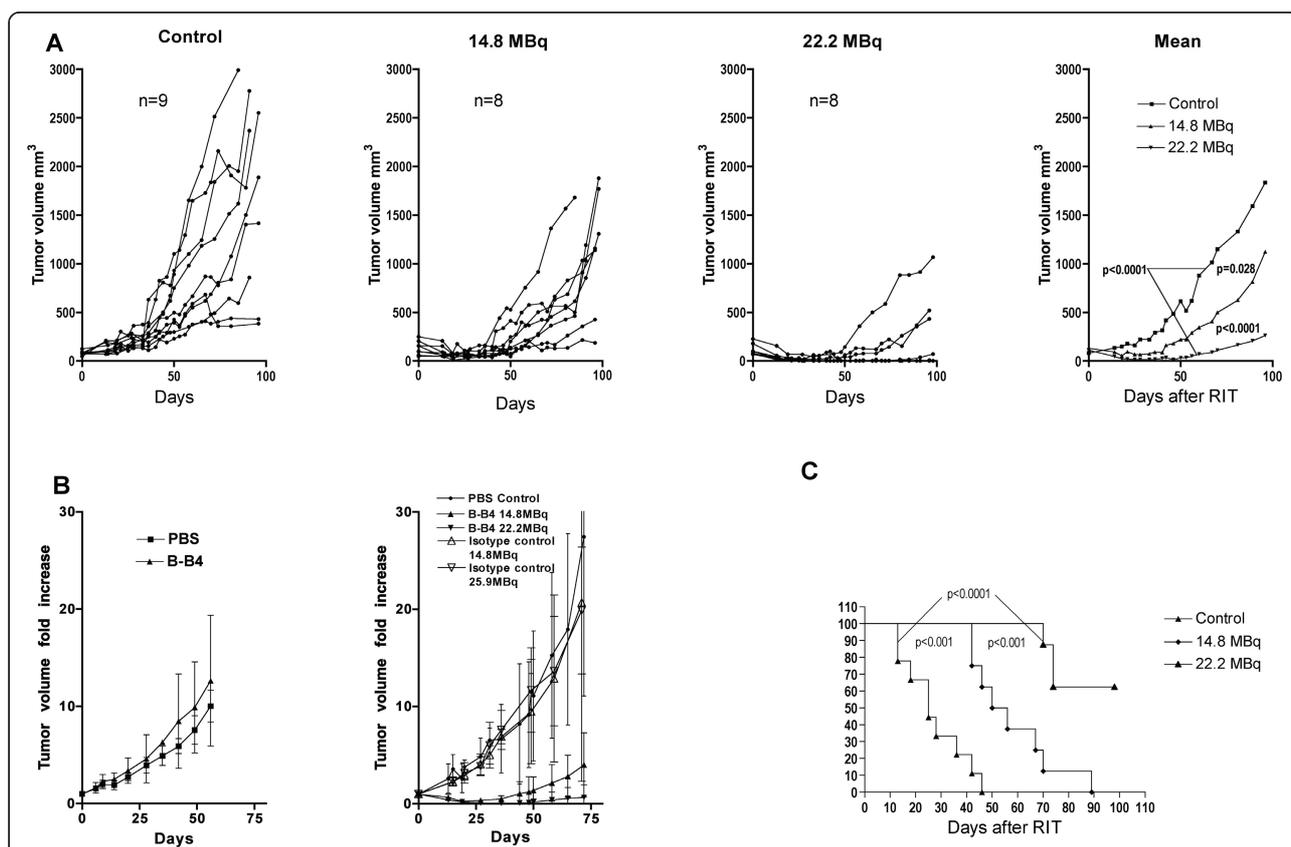


Figure 6 Radioimmunotherapy assay. (A) Tumor size variations in individual nude mice engrafted with the MDA-MB-468 cell line after treatment. Mice treated with 14.8 (n = 8) or 22.2 MBq (n = 8) of ^{131}I -labeled B-B4 mAb can be compared with control mice (n = 9) that received unlabeled B-B4 mAb. The mean tumor volume of each group of mice is represented. The curves are very significantly different for the control versus 22.2 MBq ($p < 0.0001$) and the 14.8 MBq versus the 22.2 MBq groups ($p < 0.0001$) and significantly different for the control versus the 14.8 MBq groups ($p = 0.028$). (B) The effect of the unlabeled B-B4 mAb (n=5) and PBS (n=5) were tested in an independent experiment (left panel). The effect of RIT with ^{131}I -labeled control isotype mAb (14.8, n=3 and 25.9 MBq, n=4) and ^{131}I -B-B4 (14.8, n=4 and 22.2 MBq, n=4) and control PBS (n=4) were compared (right panel). Results are expressed as fold-increase in tumor volume compared to day 0. This figure summarizes the results of two independent assays performed under the same conditions. (C) The time required for tumors to double in size in groups given 14.8 and 22.2 MBq ^{131}I -labeled B-B4 mAb compared with the control group.

tumor response by comparing the growth delay (the time required for the tumor to double in size after measurement on the day of treatment) in the control, 14.8 MBq, and 22.2 MBq ^{131}I -labeled B-B4 mAb-treated animals (Figure 6C). A statistically significant difference was found when groups were compared to each other, confirming the dose-dependent efficacy of ^{131}I -labeled B-B4 mAb RIT treatment. The mean growth delays were 28 ± 13 days and 58 ± 17 days for the control group and the 14.8 MBq groups, respectively; whereas, in the group of eight mice treated with the 22.2 MBq dose, only three had a bigger tumor at the end of the follow-up than at the date of injection. Despite the low tumor/blood ratio, this assay demonstrated that targeting low CD138-expressing triple-negative breast cancer cells with ^{131}I -labeled B-B4 mAb affords a very encouraging tumor response with only transient toxicity.

Discussion

The MDA-MB-468 cancer cell line is representative of triple-negative breast cancer that has a poor prognosis. As such, it is often used as xenografts in nude mice to test new drugs and therapeutic strategies against breast cancer. Recent studies with a variety of drugs and combination therapies, including antimetabolic agents and small molecules inhibiting several signaling pathways resulted in significant tumor growth control but in no real breakthrough. The same model was previously used for RIT studies of the RS7 antibody or its humanized equivalent hRS7 [25,26], with reported remission rates varying between 9% and 70%. The latter antibody recognizes a pancarcinoma antigen also known as EGP-1 or Trop2. In this paper, we show that when radiolabeled with appropriate iodine isotopes, the anti-CD138 (syndecan-1) antibody B-B4 shows favorable biodistribution, imaging capability, and antitumor properties in the same MDA-MB-468 xenograft model, with three PR, five CR, and three cured animals in a group of eight with established tumors, despite a relatively low expression of the target antigen. In fact, the equilibrium binding assay showed that the number of antigenic sites was as low as 1.2×10^4 per cell, which is consistent with previous reports [27,24]. This low level of CD138 expression explains the relatively low tumor/blood ratio found in the biodistribution analysis of the B-B4 antibody and the relatively high injected activity (22.2 MBq) required to cure mice from their tumor in the RIT assay. The treatment efficiency is probably explained by the long residence time of activity in the tumor. This was illustrated by immuno-PET imaging where the best tumor images were obtained 8 days after ^{124}I -labeled B-B4 injection. No adverse effects were observed at the MTD defined as 22.2 MBq. Other groups targeted breast cancer xenografts using whole antibodies radiolabeled with ^{131}I and have reported MTD ranging

from 7.4 MBq for the ^{131}I -labeled anti-Lewis Y hu3S193 antibody [28] to 44.4 MBq for the ^{131}I -labeled anti-MUC-1 Mc5 antibody [29]. Interestingly, antibodies targeting the same antigen displayed a very different MTD. Behr and colleagues targeted ACE with the mouse IgG1 mAbs MN-14 and F023C5 and observed an equivalent RIT efficacy on GW-39 colon carcinoma, with an MTD of 9.62 and 22.2 MBq, respectively [30-32]. The 22.2 activity that we determined as the MTD for ^{131}I -labeled B-B4 mAb is in the range of these previously described MTDs.

The choice of the radionuclide for imaging and therapy could influence the efficiency of these approaches. ^{131}I presents some advantages, notably the possibility of imaging and dosimetry and a low activity uptake in the liver. ^{131}I -labeled antibodies are successfully used in consolidation treatment of hepatic metastases of colon cancer after surgical removal of macroscopic lesions [33] or in the treatment of B cell lymphoma [34-36]. However, mAb labeled with iodine isotopes using the conventional chloramine-T method could result in a loss of efficacy due to the rapid escape of iodotyrosine resulting from the catabolism of the radioiodinated antibody within the lysosomal compartment, especially in the case of internalizing mAb. Several groups have reported that CD138 is internalized. However, the internalization mechanism has been described as clathrin-independent. Internalization has been shown to be fast and to involve a multistep process: ligand binding, clustering, energy-independent lateral movement into detergent-insoluble membrane rafts, and recruitment of actin and tyrosine kinases [37,38]. This mechanism has been studied by several groups using iodine-labeled ligands of CD138 or of a CD138-FcR fusion protein. Fast degradation of the ligands, like that usually observed for proteins endocytosed via clathrin-coated pits, does not seem to occur after CD138 internalization. In addition, our biodistribution data showed little decrease in tumor activity accumulation up to 96 h, while the circulating antibody concentration decreased at least threefold. In the present study of xenograft MDA MB, 468 PET imaging with ^{124}I -labeled B-B4 confirmed the accessibility of the CD138 antigen and showed a good stability of tumor activity up to 8 days post injection. Thus, deiodination of the radiolabeled antibody seemed to be limited and does not preclude the possibility of performing radioimmunotherapy with ^{131}I -B-B4. Although further studies are needed using a residualizing agent such as that described by Goldenberg and co-workers [26] or of radioactive metals such as lutetium-177 or yttrium-90 to increase the efficiency of RIT, here we show the potential of targeting CD138 for the treatment of breast cancer in the mouse model with a significant response rate despite the low number of antigen copies expressed by the triple-negative MDA-MB-468 cells.

Targeting CD138 for RIT is attractive since this antigen is associated with an aggressive breast cancer phenotype. CD138 is expressed by about 75% of ER-negative forms of breast cancer [39], and it is associated with a high histological grade, Ki 67 index, tumor size, and lymph node involvement [8,40]. RIT targeting CD138 could thus be very useful in the treatment of triple-negative breast cancer that is not eligible for hormone therapy or immunotherapy targeting Her2/neu. TNBC accounts for 10% to 17% of all breast carcinomas and among two thirds of TNBC patients express CD138 on their primary tumor. TNBC are chemosensitive, but TNBC patients with residual disease postchemotherapy have a poor outcome with an increased likelihood of distant recurrence [41]. Targeting tumor cells by RIT with ¹³¹I-labeled B-B4 mAb could offer the possibility to achieve responses on chemoresistant cancer cells for patients who relapse after intensive chemotherapy because ionizing radiations act differently on cancer cells. When considering breast cancer irrespective of the ER or PgR expression status, CD138 expression is associated with the worst prognostic marker Her2/neu. Barbareschi and colleagues reported on an additive adverse effect when both Her2/neu and CD138 were overexpressed [40]. Patients suffering from this kind of cancer can be treated by immunotherapy with herceptin associated to radioimmunotherapy with ¹³¹I-labeled B-B4 mAb in order to obtain a synergy between the two therapeutic approaches when used in association or as an additional line of treatment for patients who relapse.

It is generally accepted that RIT is more adapted to the systemic treatment of small tumors like metastasis. The expression of CD138 on primary breast tumors and in the corresponding invaded lymph node has been evaluated. The level of expression in invaded lymph nodes is at least equal to that of the primary tumor [24]. The shift of CD138 expression from epithelial cancer cells to fibroblasts of the stroma should not preclude RIT efficacy as long as the overall level of CD138 expression in the tumor ensures sufficient uptake. Indeed, the millimeter range of beta particles enables the irradiation of cells surrounding tumor epithelial cells via the cross-fire effect [42,43].

Conclusion

RIT targeting CD138 is relevant for the treatment of triple-negative breast cancer and could be applied to patients who relapse after a first-line treatment. The possibility of visualizing tumors by immuno-PET and to perform quantitative imaging prior to therapy provides the advantage of being able to assess CD138 expression in order to conclude on the feasibility of RIT [18] for each patient.

List of abbreviations

CD138: syndecan-1; ECM: extracellular matrix; ER: estrogen receptor; FGFs: fibroblast growth factors; HGF: hepatocyte growth factor; HS: heparan

sulfate; PR: progesterone receptor; RIT: radioimmunotherapy; TNBC: triple-negative breast cancer; VEGF: vascular endothelial growth factor.

Acknowledgements

This work was supported by the Grant INCa-ACI200.

Author details

¹Nuclear Medicine Dept, ICO René Gauducheau Cancer Center, IRCNA, Saint Herblain, France ²Centre de Recherche en Cancérologie de Nantes-Angers, Université de Nantes, Inserm, U892, Nantes, France ³Nuclear Medicine Dept, University Hospital, Nantes, France ⁴Pathology Dept, University Hospital, Nantes, France ⁵Gen Probe Diacalone, Besançon, France

Authors' contributions

CR carried out *in vivo* RIT experiments and immuno-PET. ALR carried out *in vivo* RIT and radiolabeled antibody quality control. KB carried out biodistribution studies. FK-B participated in the design of the study. SG carried out cell culture and participated in the *in vivo* assays. DL carried out immunohistochemistry on MDA-MB-468 tumors. CSM was responsible for the animal facility, participated in *in vivo* assays and in the radiolabeling of mAb. AF-C was responsible for high activity mAb radiolabeling. JW produced the B-B4 antibody and critically revised the manuscript. JB critically revised the manuscript and participated in drafting it. JG participated in the study design and was involved in drafting the manuscript. MC participated in the study design, critically revised the manuscript, and participated in drafting it. FD, corresponding author, designed and supervised the work.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 19 April 2011 Accepted: 1 September 2011

Published: 1 September 2011

References

1. Beauvais DM, Burbach BJ, Rapraeger AC: The syndecan-1 ectodomain regulates alphavbeta3 integrin activity in human mammary carcinoma cells. *J Cell Biol* 2004, **167**(1):171-181.
2. Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M: Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 1999, **68**:729-777.
3. Jakobsson L, Kreuger J, Holmborn K, Lundin L, Eriksson I, Kjellen L, Claesson-Welsh L: Heparan sulfate in trans potentiates VEGFR-mediated angiogenesis. *Dev Cell* 2006, **10**(5):625-634.
4. Solursh M, Reiter RS, Jensen KL, Kato M, Bernfield M: Transient expression of a cell surface heparan sulfate proteoglycan (syndecan) during limb development. *Dev Biol* 1990, **140**(1):83-92.
5. Ilan N, Elkin M, Vlodyavsky I: Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2006, **38**(12):2018-2039.
6. Derksen PW, Keehnen RM, Evers LM, van Oers MH, Spaargaren M, Pals ST: Cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates hepatocyte growth factor binding and promotes Met signaling in multiple myeloma. *Blood* 2002, **99**(4):1405-1410.
7. Yip GW, Smollich M, Gotte M: Therapeutic value of glycosaminoglycans in cancer. *Mol Cancer Ther* 2006, **5**(9):2139-2148.
8. Baba F, Swartz K, van Buren R, Eickhoff J, Zhang Y, Wolberg W, Friedl A: Syndecan-1 and syndecan-4 are overexpressed in an estrogen receptor-negative, highly proliferative breast carcinoma subtype. *Breast Cancer Res Treat* 2006, **98**(1):91-8.
9. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO: Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer* 2007, **109**(1):25-32.
10. Haffty BG, Yang Q, Reiss M, Kearney T, Higgins SA, Weidhaas J, Harris L, Hait W, Toppmeyer D: Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2006, **24**(36):5652-5657.
11. Oakman C, Viale G, Di Leo A: Management of triple negative breast cancer. *Breast* 2010, **19**(5):312-21.
12. Irvin WJ Jr, Carey LA: What is triple-negative breast cancer? *Eur J Cancer* 2008, **44**(18):2799-2805.

13. Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C, Post J, Morard F, Vita N, Laurent P, Sun RX, Klein B, Dore JM: **A plasmocytic selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1.** *Br J Haematol* 1996, **94**(2):318-323.
14. Couturier O, Faivre-Chauvet A, Filippovich IV, Thedrez P, Sai-Maurel C, Bardies M, Mishra Ak, Gauvrit M, Blain G, Apostolidis C, Molinet R, Abbe JC, Bataille R, Wijdenes J, Chatal JF, Chérel M: **Validation of 213Bi-alpha radioimmunotherapy for multiple myeloma.** *Clin Cancer Res* 1999, **5**(10 Suppl):3165s-3170s.
15. Supiot S, Faivre-Chauvet A, Couturier O, Heymann MF, Robillard N, Kraeber-Bodere F, Morandau L, Mahé 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* 2002, **94**(4 Suppl):1202-1209.
16. DeNardo SJ, O'Grady LF, Richman CM, DeNardo GL: **Overview of radioimmunotherapy in advanced breast cancer using I-131 chimeric L6.** *Adv Exp Med Biol* 1994, **353**:203-211.
17. Schrier DM, Stemmer SM, Johnson T, Kasliwal R, Lear J, Matthes S, Taffs S, Dufton C, Glenn SD, Butchko G, Ceriani RL, Rovira D, Bunn P, Shpall EJ, Bearman SI, Purdy M, Cagnoni P, Jones RB: **High-dose 90Y Mx-diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA)-BrE-3 and autologous hematopoietic stem cell support (AHSCS) for the treatment of advanced breast cancer: a phase I trial.** *Cancer Res* 1995, **55**(23 Suppl):5921s-5924s.
18. Behr TM, Sharkey RM, Juweid ME, Dunn RM, Vagg RC, Ying Z, Zhang CH, Swayne LC, Vardi Y, Siegel JA, Goldenberg DM: **Phase I/II clinical radioimmunotherapy with an iodine-131-labeled anti-carcinoembryonic antigen murine monoclonal antibody IgG.** *J Nucl Med* 1997, **38**(6):858-870.
19. Milligan T, Carrasquillo JA, Chung Y, Milenic DE, Schlom J, Feuerstein I, Paik C, Perentesis P, Reynolds J, Curt G, Goeckeler W, Fordyce W, Cheng R, Riseberg D, Cowan K, O'Shauffnessy J: **Phase I study of intravenous Lu-labeled CC49 murine monoclonal antibody in patients with advanced adenocarcinoma.** *Clin Cancer Res* 1995, **1**(12):1447-1454.
20. Oliveras-Ferreros C, Vazquez-Martin A, Lopez-Bonet E, Martin-Castillo B, Del Barco S, Brunet J, Menendez JA: **Growth and molecular interactions of the anti-EGFR antibody cetuximab and the DNA cross-linking agent cisplatin in gefitinib-resistant MDA-MB-468 cells: new prospects in the treatment of triple-negative/basal-like breast cancer.** *Int J Oncol* 2008, **33**(6):1165-1176.
21. Bernardeau K, Gouard S, David G, Ruellan AL, Devys A, Barbet J, Bonneville M, Chérel M, Davodeau F: **Assessment of CD8 involvement in T cell clone avidity by direct measurement of HLA-A2/Mage3 complex density using a high-affinity TCR like monoclonal antibody.** *Eur J Immunol* 2005, **35**(10):2864-2875.
22. Fraker PJ, Speck JC Jr: **Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphrenylglycoluril.** *Biochem Biophys Res Commun* 1978, **80**(4):849-857.
23. Lindmo T, Boven E, Cuttitta 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**(1):77-89.
24. Burbach BJ, Friedl A, Mundhenke C, Rapraeger AC: **Syndecan-1 accumulates in lysosomes of poorly differentiated breast carcinoma cells.** *Matrix Biol* 2003, **22**(2):163-77.
25. Shih LB, Xuan H, Aninipot R, Stein R, Goldenberg DM: **In vitro and in vivo reactivity of an internalizing antibody, RS7, with human breast cancer.** *Cancer Res* 1995, **55**(23 Suppl):5857s-5863s.
26. Govindan SV, Stein R, Qu Z, Chen S, Andrews P, Ma H, Hansen HJ, Griffiths GL, Horak ID, Goldenberg DM: **Preclinical therapy of breast cancer with a radiiodinated humanized anti-EGP-1 monoclonal antibody: advantage of a residualizing iodine radiolabel.** *Breast Cancer Res Treat* 2004, **84**(2):173-182.
27. Gotte M, Kersting C, Radke I, Kiesel L, Wulfgang P: **An expression signature of syndecan-1 (CD138), E-cadherin and c-met is associated with factors of angiogenesis and lymphangiogenesis in ductal breast carcinoma in situ.** *Breast Cancer Res* 2007, **9**(1):R8.
28. Clarke K, Lee FT, Brechbiel MW, Smyth FE, Old LJ, Scott AM: **Therapeutic efficacy of anti-Lewis(y) humanized 35193 radioimmunotherapy in a breast cancer model: enhanced activity when combined with taxol chemotherapy.** *Clin Cancer Res* 2000, **6**(9):3621-3628.
29. Peterson JA, Blank EW, Ceriani RL: **Effect of multiple, repeated doses of radioimmunotherapy on target antigen expression (breast MUC-1 mucin) in breast carcinomas.** *Cancer Res* 1997, **57**(6):1103-1108.
30. Behr TM, Memtsoudis S, Sharkey RM, Blumenthal RD, Dunn RM, Gratz S, Wieland E, Nebendahl K, Schmidberger H, Goldenberg DM, Becker W: **Experimental studies on the role of antibody fragments in cancer radioimmunotherapy: influence of radiation dose and dose rate on toxicity and anti-tumor efficacy.** *Int J Cancer* 1998, **77**(5):787-795.
31. Behr TM, Wulst E, Radetzky S, Blumenthal RD, Dunn RM, Gratz S, Rave-Fränk M, Schmidberger H, Raue F, Becker W: **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.
32. Behr TM, Sgouros G, Vougiokas V, Memtsoudis S, Gratz S, Schmidberger H, Blumenthal RD, Goldenberg DM, Becker W: **Therapeutic efficacy and dose-limiting toxicity of Auger-electron vs. beta emitters in radioimmunotherapy with internalizing antibodies: evaluation of 125I- vs. 131I-labeled CO17-1A in a human colorectal cancer model.** *Int J Cancer* 1998, **76**(5):738-48.
33. Liersch T, Meller J, Bittrich M, Kulle B, Becker H, Goldenberg DM: **Update of carcinoembryonic antigen radioimmunotherapy with (131I)-Habetuzumab after salvage resection of colorectal liver metastases: comparison of outcome to a contemporaneous control group.** *Ann Surg Oncol* 2007, **14**(9):2577-2590.
34. Leahy MF, Turner JH: **Radioimmunotherapy of relapsed indolent non-Hodgkin lymphoma with 131I-rituximab in routine clinical practice: 10-year single-institution experience of 142 consecutive patients.** *Blood* 2011, **117**(1):45-52.
35. Leahy MF, Seymour JF, Hicks RJ, Turner JH: **Multicenter phase II clinical study of iodine-131-rituximab radioimmunotherapy in relapsed or refractory indolent non-Hodgkin's lymphoma.** *J Clin Oncol* 2006, **24**(27):4418-4425.
36. Jacene HA, Filice R, Kasecamp W, Wahl RL: **Comparison of 90Y-ibritumomab tiuxetan and 131I-tositumomab in clinical practice.** *J Nucl Med* 2007, **48**(11):1767-1776.
37. Wilsie LC, Gonzales AM, Orlando RA: **Syndecan-1 mediates internalization of apoE-VLDL through a low density lipoprotein receptor-related protein (LRP)-independent, non-clathrin-mediated pathway.** *Lipids Health Dis* 2006, **5**:23.
38. Fuki IV, Meyer ME, Williams KJ: **Transmembrane and cytoplasmic domains of syndecan mediate a multi-step endocytic pathway involving detergent-insoluble membrane rafts.** *Biochem J* 2000, **351**(Pt 3):607-12.
39. Leivonen M, Lundin J, Nordling S, von Boguslawski K, Haglund C: **Prognostic value of syndecan-1 expression in breast cancer.** *Oncology* 2004, **67**(1):11-18.
40. Barbareschi M, Maisonneuve P, Aldovini D, Cangi MG, Pecciarini L, Angelo Mauri F, Veronese S, Caffo O, Lucenti A, Palma PD, Galligioni E, Dogliani C: **High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis.** *Cancer* 2003, **98**(3):474-83.
41. Gopal AK, Press OW, Wilbur SM, Maloney DG, Pagel JM: **Rituximab blocks binding of radiolabeled anti-CD20 antibodies (Ab) but not radiolabeled anti-CD45 Ab.** *Blood* 2008, **112**(3):830-835.
42. Maeda T, Desouky J, Friedl A: **Syndecan-1 expression by stromal fibroblasts promotes breast carcinoma growth in vivo and stimulates tumor angiogenesis.** *Oncogene* 2006, **25**(9):1408-1412.
43. Mennerich D, Vogel A, Klamann I, Dahl E, Lichtner RB, Rosenthal A, Pohlentz HD, Thierauch KH, Sommer A: **Shift of syndecan-1 expression from epithelial to stromal cells during progression of solid tumours.** *Eur J Cancer* 2004, **40**(9):1373-1382.

doi:10.1186/2191-219X-1-20

Cite this article as: Rousseau et al.: Syndecan-1 antigen, a promising new target for triple-negative breast cancer immuno-PET and radioimmunotherapy. A preclinical study on MDA-MB-468 xenograft tumors. *EJNMMI Research* 2011 **1**:20.

I. De la radioimmunothérapie à l'immunoTEP avec l'anti-CD138 (B-B4) marqué à l'iode 124 dans un modèle de xénogreffe de cancer du sein triple négatif

II.1. Résumé

La surexpression du syndecan-1 (CD138) dans le cancer du sein est corrélée à un phénotype agressif et un pronostic défavorable. L'objectif de cette étude a été de comparer l'imagerie TEP avec le ^{124}I -B-B4 à l'imagerie FDG et FLT et aux données de pharmacocinétique et de biodistribution obtenues avec le ^{124}I -B-B4 dans un modèle de cancer du sein triple négatif, dans le but de valider l'immunoTEP ciblant le CD138.

L'immunoréactivité du ^{124}I -B-B4 a été déterminée par un test Lindmo sur les cellules MDA-MB-468. Une étude immuno-histochimique a été réalisée sur des coupes de tumeur. Une imagerie TEP a été réalisée d'une part avec le FDG et la FLT, 1h après l'injection des traceurs, d'autre part avec l'anticorps ^{124}I -B-B4 à 1, 2, 3, 4 et 8 jours après l'injection, chez des souris greffées en sous-cutané avec la lignée MDA-MB-468. L'étude d'imagerie a été suivie d'une étude de la biodistribution du ^{124}I -B-B4 aux mêmes temps que les immunoTEP.

L'immunoréactivité du ^{124}I -B-B4 a été évaluée à $48,7\% \pm 3,3$. L'immuno-marquage a permis de révéler de manière intense la présence de CD138 membranaire sur la lignée cellulaire MDA MB 468 connue comme étant de phénotype triple négatif. La fixation tumorale maximale du ^{124}I -B-B4 a été obtenue 48h après l'injection du radio-immunoconjugué ($5,28\% \text{ ID/g}$). L'accumulation maximale au niveau des organes sains a été obtenue à 24h, une diminution a ensuite été observée avec une cinétique similaire à celle du sang. Les données de pharmacocinétique obtenues à partir de l'imagerie ou de la biodistribution au ^{124}I -B-B4 ont été concordantes. Les rapports T/M (Tumeur/Muscle) en TEP FDG et FLT ont été respectivement de $1,67 \pm 0,24$ et $5,28 \pm 0,49$ soit inférieurs à celui calculé pour l'iTEP au ^{124}I -B-B4 ($12,17 \pm 0,62$ à 96h). Ce travail pré-clinique confirme la faisabilité de l'approche d'immunoTEP avec l'anticorps ^{124}I -B-B4 pour les tumeurs mammaires triple négatives exprimant le syndecan-1, avec des intérêts potentiels diagnostiques, pronostiques et pré-thérapeutiques.

II.2. Introduction

Le cancer triple négatif représente 15% des cancers invasifs du sein et est caractérisé par l'absence d'expression des récepteurs hormonaux et de Her2. Il est associé à mauvais pronostic (Foulkes et coll., 2010). Cette tumeur agressive ne peut bénéficier de l'hormonothérapie ni du trastuzumab du fait de son phénotype triple négatif. Or, au stade métastatique, du fait de l'agressivité de cette tumeur, il faut proposer aux patientes une autre thérapie.

Des techniques d'imagerie performantes doivent également pouvoir être proposées aux différentes étapes de la prise en charge pour évaluer l'étendue de la maladie et la réponse aux traitements. L'imagerie TEP dans le cancer du sein repose surtout actuellement sur le FDG pour la recherche de métastases et le monitoring de la réponse tumorale. Lors du bilan pour suspicion de métastases, cette technique a montré des performances très supérieures à celles de l'imagerie conventionnelle (mammographie, échographie, scanner et scintigraphie osseuse) avec respectivement pour la TEP FDG 97, 82, 87, 96 et 90% pour la sensibilité, spécificité, VPP, VPN et l'exactitude de la TEP versus 87, 88, 95, 70 et 87% pour l'imagerie conventionnelle (Gallowitsch et coll., 2003). La FLT dans cette indication est surtout décrite comme un traceur de prédiction de la réponse tumorale au traitement. En clinique, 3 équipes seulement se sont intéressées au sous-groupe « triple négatif » du cancer du sein avec le FDG (Groheux et coll. 2012 ; Basu et coll., 2008, Tchou et coll., 2010) et aucune avec la FLT.

Dans le cancer du sein, le syndecan-1 (CD 138) peut être exprimé soit à la surface des cellules épithéliales soit dans le stroma ou les deux ce qui en fait une cible de choix pour de la RIT. Le B-B4 est un AcM murin ciblant le syndecan-1 (Wijdenes et coll. 1996) qui a été utilisé dans une étude récente chez l'animal montrant que la radioimmunothérapie (RIT) avec le ¹³¹I-B-B4 pouvait être considérée comme une thérapie ciblée prometteuse du cancer métastatique triple négatif CD138+ (Rousseau et coll., 2011).

Etant donné sa valeur pronostique, le syndecan-1 pourrait être considéré aussi comme un biomarqueur intéressant pour le diagnostic moléculaire dans le carcinome mammaire. En clinique, son expression est étudiée par immunohistochimie lors du bilan initial sur le prélèvement biopsique de la tumeur primitive. Cependant, ce statut tumoral peut évoluer au cours du temps ainsi qu'après traitement et peut être différent au niveau

des différentes lésions secondaires d'un même patient (Dijkers et coll., 2008). Réaliser des biopsies multiples serait une approche intéressante pour appréhender le statut syndecan-1 au cours de l'évolution de la maladie. Toutefois, il ne semble pas licite d'imposer aux patientes ces techniques invasives (Lear-Kaul et coll., 2003). La tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie tridimensionnelle non invasive corps entier dont les performances ont été établies avec la validation du [¹⁸F]-fluoro-déoxyglucose (FDG) dans de nombreuses indications en oncologie. Mais le FDG n'est pas un traceur spécifique ; aujourd'hui, la disponibilité de nouveaux vecteurs biologiques et de radioéléments innovants émetteurs de positons de périodes physiques variées permettent le développement de nouveaux traceurs pour caractériser spécifiquement la maladie à l'échelle du corps entier par une imagerie dite phénotypique. Dans ce contexte, les anticorps monoclonaux apparaissent être des vecteurs particulièrement adaptés et l'immunoTEP, une imagerie potentiellement prometteuse, ce d'autant que de nombreux anticorps sont en développement en oncologie (Wu et coll., 2009 ; van Dongen et coll. 2007). Dans le cancer du sein triple négatif, une imagerie TEP au syndecan-1 pourrait être une stratégie non invasive pour déterminer l'expression syndecan-1 à l'échelle du corps entier et obtenir un diagnostic moléculaire fiable avec un impact thérapeutique possible.

L'objectif de cette étude a été de comparer l'imagerie TEP avec le ¹²⁴I-B-B4 à l'imagerie FDG et FLT et aux données de pharmacocinétique et de biodistribution obtenues avec le ¹²⁴I-B-B4 dans un modèle de cancer du sein triple négatif, dans le but de valider l'immunoTEP ciblant le CD138.

II.3. Matériel et Méthodes

II.3.1. Lignée cellulaire et modèle animal

La lignée cellulaire et le modèle animal ont déjà été décrits page 92 du manuscrit.

II.3.2. Immunohistochimie tumorale

Les blocs d'inclusion en paraffine ont été coupés à 3 µm et les coupes étalées sur des lames SuperFrost. Les lames ont été déparaffinées dans deux bains de toluène, puis réhydratées et rincées. Après un prétraitement au bain marie à 95°C dans du tampon EDTA ou citrate selon les anticorps, les peroxydases endogènes ont été inhibées par

une solution de peroxyde d'hydrogène à 3%. Les coupes ont été incubées pendant 30 minutes avec les anticorps primaires dont les caractéristiques sont les suivantes : récepteurs aux oestrogènes (clone 6F11, 1 :100, Novocastra) ; récepteurs à la progestérone (clone 16, 1 :100, Novocastra) ; KI67 (clone MIB1, 1 :150, Dako) ; Her2 (1 : 800, Dako). L'expression du syndecan-1 a été confirmée par une technique d'amplification streptavidine peroxydase standard (ChemMate kit, Dako, Glostrup, Denmark). Un anticorps primaire spécifique du syndecan-1 (clone M115, 1 :100, Dako) a permis de mettre en évidence la présence de CD138 sur les coupes de tumeurs. L'anticorps secondaire biotinylé a été ensuite appliqué puis le complexe streptavidine-biotine peroxydase a été déposé. Le marquage a été révélé par la diamino-benzidine. Pour les contrôles négatifs, la procédure d'immunomarquage a été réalisée en omettant l'anticorps primaire. Les coupes tumorales ont été colorées par Hematoxylin Harris (Merck, France).

En ce qui concerne les récepteurs aux oestrogènes et à la progestérone, seul le marquage nucléaire était considéré comme positif, avec un seuil à 10%. Le score Her2 était réalisé selon les recommandations en vigueur (Wolff et coll., 2007).

II.3.3. Marquage de l'anticorps B-B4 à l'iode 124 et contrôles

Le marquage de l'anticorps monoclonal B-B4 pour l'immunoTEP était réalisé selon le principe de la méthode à l'Iodogen (Fraker et coll., 1978). Brièvement, à 1,7 mg de B-B4 (350 µL) en tampon de phosphate 0,1 M à pH 7 contenu dans un flacon de verre de 10 mL, sont ajoutés respectivement 230 µL (222 MBq) de ¹²⁴I-Na et 20 µL (0,1 mg) de tetraphenylglouril (Iodogen). Après 15 min d'incubation du mélange à température ambiante, l'anticorps radiomarqué a été purifié par chromatographie sur une colonne gel d'exclusion-diffusion type NAPTM-5 (GE Healthcare Royaume-Uni, Little Chalfont Buckinghamshire, Royaume-Uni). Le pic chromatographique d'¹²⁴I-B-B4 a été récupéré dans 1,15 ml. L'activité spécifique était de 90 MBq/mg. La pureté radiochimique de l'anticorps radiomarqué a été déterminée par chromatographie en couche mince (ITLC-SG ; Varian ; France) en utilisant une solution d'acide trichloracétique à 10% w/v dans l'eau comme phase mobile. Elle a été mesurée à plus

de 98%. L'immunoréactivité du ^{124}I -B-B4 a été évaluée à $48,7\% \pm 3,3$ par « le test de Lindmo » en utilisant des cellules CD138^+ (U266) (Lindmo et coll., 1984).

II.3.4. Imagerie TEP

L'immunoTEP avec le B-B4 marqué à l'iode 124 a été réalisée sur six souris NMRI-nu (nu/nu) greffées de cellules MDA-MB-468. Une activité de 3,3 MBq de ^{124}I -B-B4 (33 μg) a été injectée par voie intraveineuse, et les images TEP ont été acquises à 1, 2, 3, 4, et 8 jours après l'injection, avec une TEP Inveon scanner (Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN, USA) sous anesthésie (isoflurane- O_2). Un scanner a été réalisé en utilisant le module scanner (Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN, USA). Les données TEP ont été acquises pendant 20 min (une position de lit), et les sinogrammes 3D ont été reconstruits en utilisant un algorithme OSEM 3D (2 itérations et 12 ensembles) suivi de 18 itérations MAP.

Une imagerie TEP au ^{18}F FDG ainsi qu'à la ^{18}F FLT a été réalisée, chacune sur trois souris NMRI-nu (nu/nu) greffées de cellules MDA-MB-468 après une injection intraveineuse de 6,2 MBq de ^{18}F FDG ou de 6 MBq de ^{18}F FLT. Les images TEP ont été acquises 1 h après l'injection selon la même procédure que pour l'immunoTEP. Les images TEP ont été analysées qualitativement et quantitativement. La valeur moyenne et maximale de la concentration volumique dans chaque zone d'intérêt (tumeur, muscle, cœur et foie) a été mesurée en reportant une ROI volumique centrée sur la zone. Les rapports Tumeur/Muscle (T/M), Tumeur/Cœur (T/M) et Tumeur/Foie (T/F) ont été calculés pour l'immunoTEP ainsi que le rapport T/M pour les imageries FDG et FLT.

II.3.5. Etude de biodistribution du ^{124}I -B-B4

Cette étape a permis de suivre la distribution et la fixation du ^{124}I -B-B4 au sein des différents organes des souris *nude* greffées avec la lignée MDA-MB-468. La biodistribution du ^{124}I -B-B4 a été réalisée à l'issue de l'immunoTEP, le prélèvement des organes a donc été réalisé à 1, 2, 3, 4, et 8 jours après l'injection. La radioactivité de chaque organe a été mesurée au compteur γ et le pourcentage de l'activité injectée par gramme de tissu (%ID/g) calculé après correction de décroissance.

II.3.6. Etudes pharmacocinétiques

Les données quantitatives obtenues par imagerie TEP et par sacrifice (biodistribution) ont été analysées en utilisant un modèle multi-compartimental et un logiciel développé au laboratoire. L'élimination sanguine a été représentée par un seul compartiment car les mesures n'ont été effectuées qu'à partir de 24 heures. L'activité présente dans les tissus (tumeur, foie et cœur) a été représentée par la somme d'une fraction en échange rapide avec le compartiment central, définie par un coefficient ajustable, et d'un compartiment spécifique représentant la rétention de radioactivité. Les échanges ont été supposés linéaires. Après une première analyse, il s'est avéré que les activités mesurées dans le cœur et le foie étaient entièrement expliquées par la fraction en échange rapide avec le compartiment central. Les constantes d'élimination et de transfert entre compartiment central et tumeur, ainsi que les coefficients représentant l'activité en équilibre rapide avec le compartiment central et le volume de ce compartiment central ont été ajustés sur les valeurs expérimentales. Les données sanguines ont été utilisées comme fonction d'entrée dans l'analyse des cinétiques d'imagerie.

II.4. Résultats

II.4.1. Immunohistochimie des tumeurs MDA-MB 468

L'expression du CD138 a été évaluée sur des coupes de tumeur prélevée sur une souris *nude* préalablement greffée avec la lignée MDA-MB-468. La figure 33 (**C**) en représente les résultats. On remarque que les trabécules du tissu mammaire sont associées à un important polymorphisme nucléaire, une forte activité mitotique (**B**) ainsi qu'à un aspect de nécrose centrale (**A**). L'immunomarquage a révélé de manière intense la présence de CD138 membranaire. Il a été aussi mis en évidence l'absence d'expression des récepteurs aux oestrogènes (**E**), à la progestérone (**F**) et de Her2 (**D**) ce qui permet à cette lignée de se développer sans traitement hormonal concomitant en expérimentation animale et fait d'elle un modèle de cancer du sein triple négatif. De plus, pour cette tumeur, on a remarqué un index de prolifération élevé KI67 (**G** et **H**).

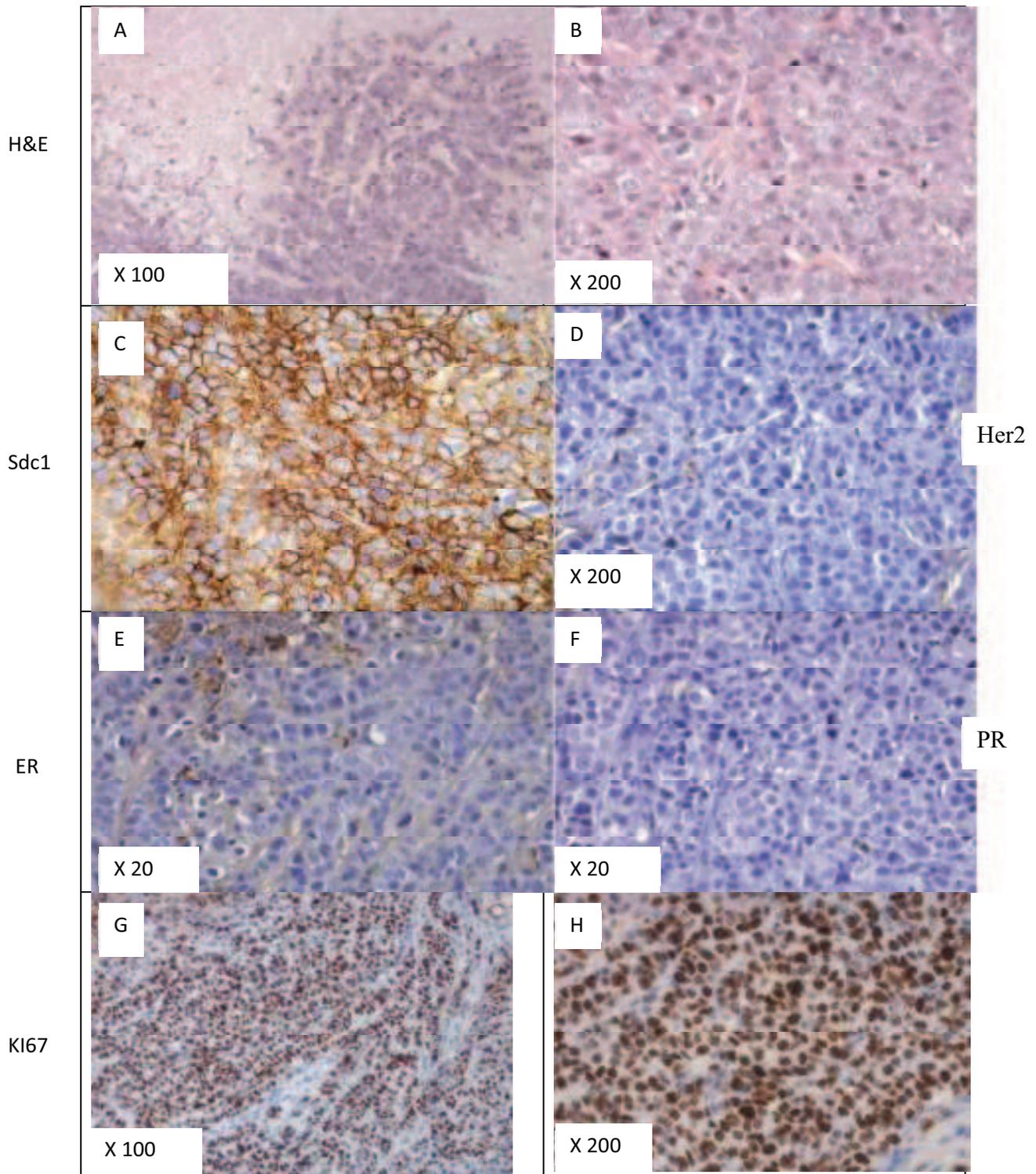


Figure 33: Lignée cellulaire humaine (MDA-MB 468) de cancer du sein triple négatif. (A) Hématoxyline-éosine (H&S): tumeur avec d'importantes zones nécrotiques. (B): grandes cellules tumorales avec un important pléomorphisme nucléaire et un index mitotique élevé. (C): immunohistochimie du CD138. (D): immunohistochimie Her2 avec un anticorps polyclonal (Dako): pas de marquage membranaire (score 0). (E) et (F): Récepteurs aux oestrogènes et à la progestérone: absence d'immunomarquage des cellules carcinomateuses. (G) et (H): immunomarquage des cellules carcinomateuses pour le Ki67 (anticorps MIB-1) montrant un marquage nucléaire de 90%.

II.4.2. Biodistribution du ^{124}I -B-B4

A l'issue de chaque immunoTEP, une étude de la biodistribution du ^{124}I -B-B4 sur la souris imagée a été réalisée. La fixation tumorale maximale du ^{124}I -B-B4 a été obtenue 48h après l'injection du radioimmunoconjugué (5,28% ID/g). La fixation a ensuite diminué, atteignant à 192h une valeur égale à 1,4% ID /g (Figure 34).

Figure 34 : Etude de la biodistribution du ^{124}I -B-B4, sur des souris *nude* greffées avec 5.10^6 de cellules de la lignée MDA-MB-468 de cancer du sein humain. La fixation du radioimmunoconjugué est représentée par le pourcentage de la dose initiale injectée par gramme (%ID/g), de chaque organe ou tissu prélevé.

Les plus fortes fixations ont été observées à 24h pour les organes sains les plus vascularisés comme le cœur (2,77%ID/g), les poumons (2,62%ID/g) ou le foie (2,04%ID/g).

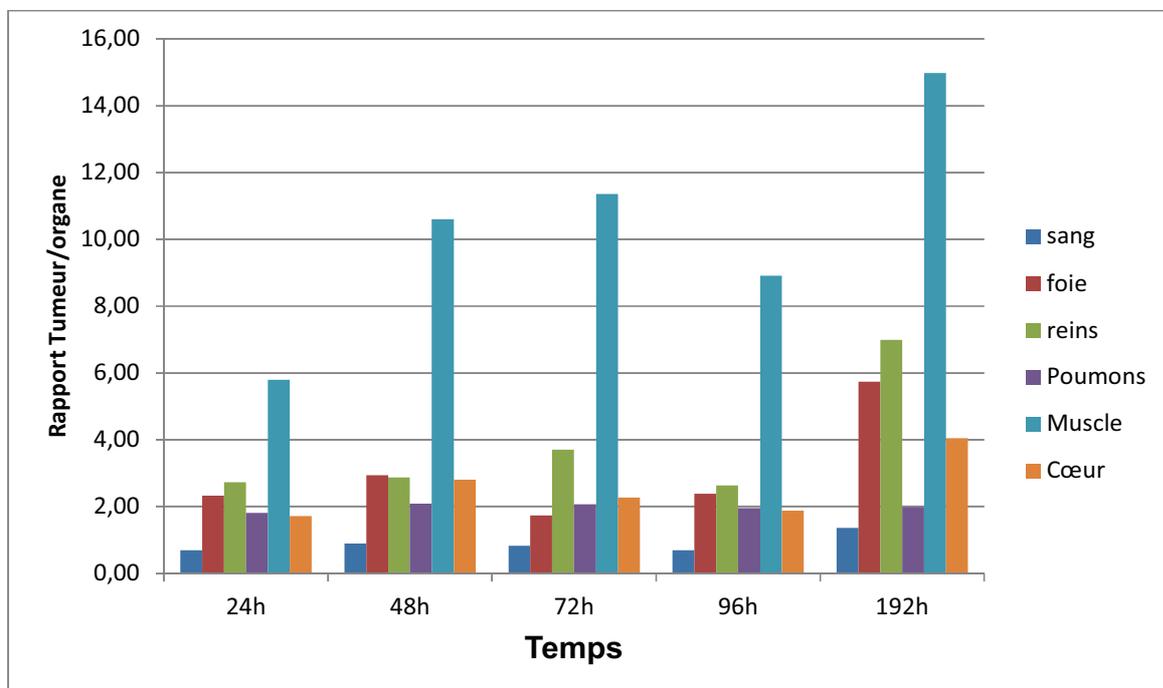


Figure 35 : Rapports Tumeur/organes sains calculés à partir des données de biodistribution du ^{124}I -B-B4 pour chaque temps de sacrifice.

	24h	48h	72h	96h	192h
sang	0,70	0,89	0,83	0,69	1,35
foie	2,32	2,94	1,74	2,38	5,74
reins	2,72	2,87	3,70	2,63	6,99
Poumons	1,81	2,09	2,07	1,95	1,98
Muscle	5,79	10,60	11,35	8,91	14,97
Cœur	1,71	2,80	2,26	1,88	4,05

Tableau 6 : Rapports Tumeur/Tissus sains calculés à partir des données de biodistribution du ¹²⁴I-B-B4 pour chaque temps de sacrifice.

L'accumulation maximale au niveau des organes sains a été observée 24h après l'injection du traceur. Une diminution a ensuite été observée avec une cinétique similaire à la cinétique sanguine (Figure 35 et tableau 5).

II.4.3. TEP au FDG et à la FLT

Une imagerie par TEP FDG et FLT a été réalisée chez des souris greffées avec des cellules MDA-MB-468, 1h après l'injection de 6,2 MBq de FDG et de 6 MBq de FLT (Figure 36).

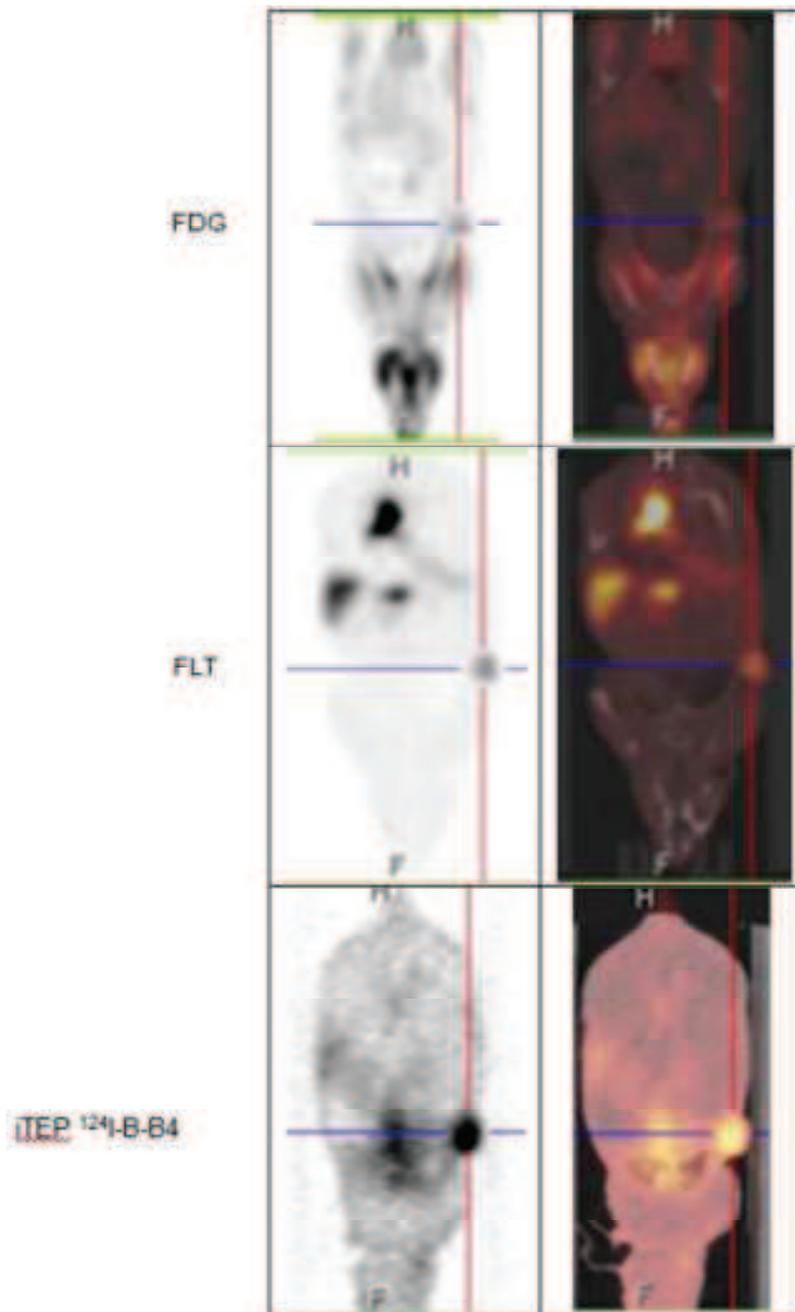


Figure 36 : Comparaison des images TEP de souris avec des tumeurs MDA-MB 468 sous cutanées 1h après l'injection de 6,2 MBq de FDG et 6 MBq de FLT avec celles d'immunoTEP (iTEP) à 96h après injection de 3,3 MBq de $^{124}\text{I-B-B4}$ avec les images de fusion correspondantes.

	FDG	FLT
T/M mean	1,67±0,24	5,28±0,49
T/M max	1,03±0,12	5,30±0,12

Tableau 7 : Moyennes des rapports tumeur/muscle (T/M) calculées sur les images TEP FDG et FLT 1h après l'injection de chaque traceur.

II.4.4. ImmunoTEP au ^{124}I -B-B4

L'anticorps monoclonal B-B4 a été marqué à l'iode 124 pour réaliser une immunoTEP chez les mêmes souris greffées avec des cellules MDA-MB-468. L'imagerie a été effectuée à 1, 2, 3, 4 et 8 jours après l'injection de 3,3 MBq d' ^{124}I -B-B4 (Figure 37).

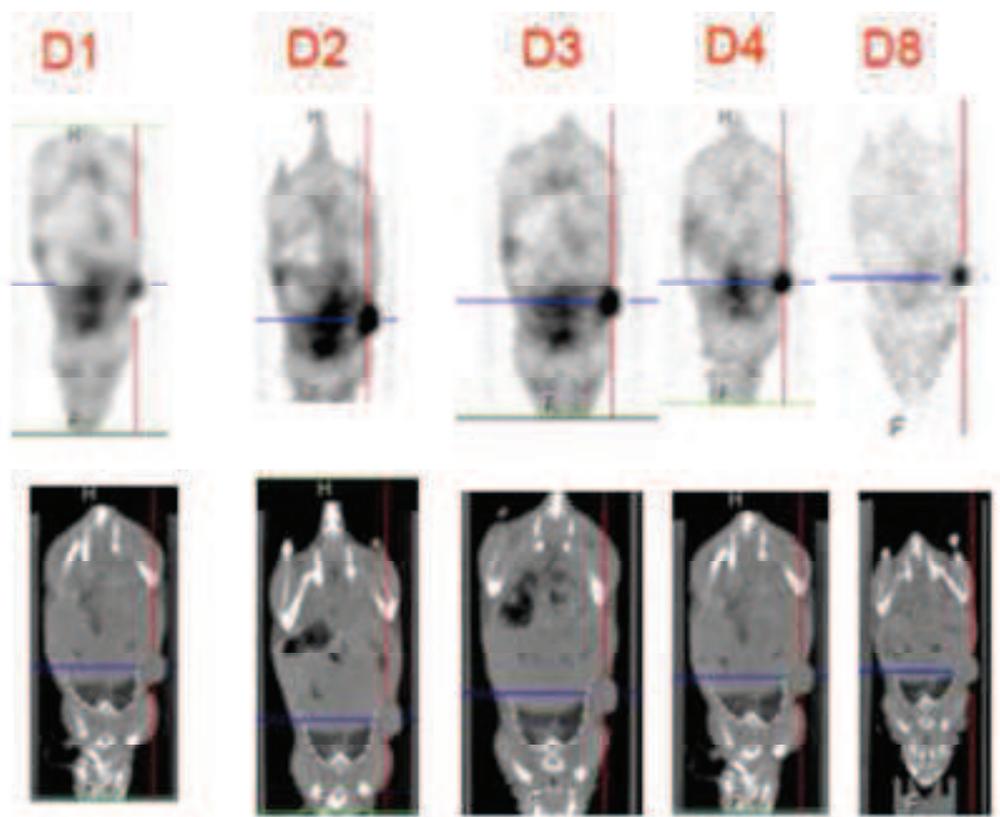


Figure 37 : Images d'immunoTEP de souris avec des tumeurs MDA-MB 468 sous cutanées 1, 2, 3, 4 et 8 jours après l'injection de 3,3 MBq de ^{124}I -B-B4 et les images scannographiques correspondantes.

Les images d'immunoTEP ont confirmé les résultats de la biodistribution : avec une imagerie de la tumeur dès le premier jour associée à une intense activité dans le cœur et le sang. Au deuxième jour, quand la fixation de l'anticorps sur la tumeur a atteint son maximum, la fixation a été intense et comparable à celle du cœur, ce qui était en conformité avec les données de biodistribution. Enfin, au huitième jour, la persistance de l'anticorps marqué au sein de la tumeur associée à sa moindre représentation dans le sang, a conduit à une image bien contrastée de la tumeur avec peu de signal dans les tissus normaux. Les rapports Tumeur/Foie (T/F), Tumeur/Cœur (T/C) et Tumeur/Muscle (T/M) ont été calculés sur les images TEP et ont montré une augmentation au cours du temps (Tableau 7). Le rapport T/M (donnée quantitative) a confirmé l'excellent contraste tumoral constaté qualitativement sur l'image d'immunoTEP à 192h.

	24h	48h	72h	96h	192h
T/F mean	0,98±0,15	1,50±0,10	1,50±0,30	2,50±0,10	2,58
T/F max	0,86±0,11	1,40±0,12	1,58±0,21	2,42±0,28	2,40
T/C mean	0,68±0,04	0,85±0,03	0,88±0,17	1,11±0,12	1,58
T/C max	0,63±0,03	0,85±0,01	0,96±0,02	1,12±0,15	1,47
T/M mean	5,05±0,48	4,39±0,57	6,07±0,18	12,17±0,62	10,12
T/M max	4,44±0,45	4,97±0,87	4,89±0,27	6,19±0,46	4,51

Tableau 8 : Moyennes des rapports tumeur/foie (T/F en noir), tumeur/cœur (T/C en rouge) et tumeur/muscle (T/M en bleu) calculées sur les images TEP au cours du temps (une seule souris imagée à J8).

II.4.5. Modélisation pharmacocinétique

La comparaison entre les données obtenues par sacrifice et en imagerie TEP a été effectuée à partir de la modélisation pharmacocinétique des données. Cette modélisation est une modélisation compartimentale simple, linéaire, utilisant un seul compartiment pour représenter la cinétique sanguine ce d'autant que les données aux temps courts sont insuffisantes pour caractériser une phase de distribution, au demeurant peu importante pour un anticorps. La cinétique de l'activité dans les tissus d'intérêt (tumeur, cœur et foie qui sont les plus aisément quantifiables en imagerie) est modélisée par une fraction de l'activité sanguine à laquelle est ajoutée, pour la tumeur seulement, l'activité distribuée dans un compartiment spécifique de la tumeur. Pour les

autres organes (cœur et foie), les cinétiques sont parallèles à la cinétique sanguine indiquant un échange rapide entre ces tissus et le sang.

Dans ces conditions, une modélisation simultanée des divers tissus est possible sous forme de courbes parallèles en représentation semi logarithmique. Seule la tumeur montre une fixation lente de l'activité avec une rétention prolongée (Figure 38).

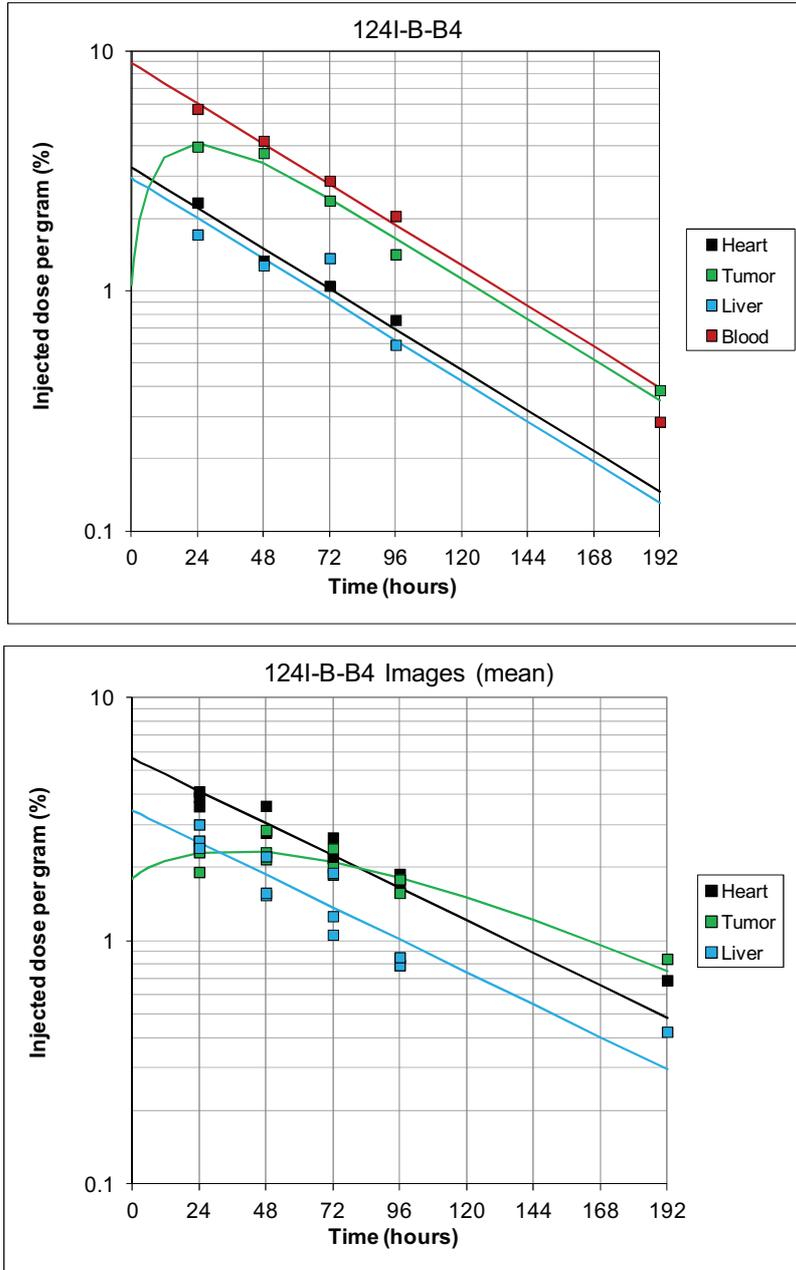


Figure 38 : Modélisation des cinétiques dans les tissus d'intérêt. *Les activités exprimées en % de dose injectée par gramme sont calculées soit après sacrifice, pesée et comptage des tissus, soit par la quantification des images TEP dans des zones d'intérêt. Les courbes représentent les valeurs ajustées pour le modèle multi-compartimental. Toutes les valeurs sont corrigées pour la décroissance de la radioactivité (iode 124). Le panneau supérieur représente les données de sacrifice et celui du bas les données d'imagerie.*

On note en revanche que les activités mesurées par sacrifice ne correspondent pas, en valeur absolue, aux valeurs mesurées par imagerie. La plus grande différence est observée pour le cœur. Ceci pourrait être expliqué par la différence de volume sanguin pris en compte que l'animal soit vivant (imagerie) ou sacrifié (dissection et exsanguination partielle des tissus). Il faut également tenir compte du petit nombre d'animaux utilisés dans ces expériences.

II.5. Discussion

A notre connaissance, c'est la première fois que la faisabilité de l'immunoTEP (iTEP) avec le ^{124}I -B-B4, anticorps monoclonal original, est étudiée dans un modèle de cancer du sein triple négatif (lignée tumorale MDA-MB-468).

La littérature rapporte aujourd'hui plusieurs études pré-cliniques et cliniques suggérant les potentialités de l'immunoTEP, avec un marquage avec le zirconium 89 ou l'iode 124. Un exemple très prometteur concerne l'utilisation de l'AcM chimérique cG250 anti-carbonic anhydrase-IX (CAIX) marqué à l'iode 124 pour la caractérisation des masses rénales (Divgi et coll., 2007). Le CAIX est, en effet, exprimé par plus de 90% des carcinomes rénaux à cellules claires. La TEP au ^{124}I -cG250 (^{124}I -girentuximab) a été évaluée dans une série de 26 patients porteurs de masses rénales. Une sensibilité de 94% et une spécificité de 100% ont été obtenues pour les carcinomes rénaux à cellules claires permettant de proposer l'approche d'immunoTEP comme alternative à la biopsie considérée comme invasive. Un cas de faux négatif dans cette série de 26 patients était expliqué par une masse tumorale largement nécrotique. Ces résultats ont été confirmés dans un essai de Phase III sur 226 patients suspects de cancer du rein avec une sensibilité de 86% et une spécificité de 87% (Pryma et coll., 2011). Par ailleurs, la faisabilité de l'immunoTEP avec l'IgG anti-CD44v6 U36 marqué au ^{89}Zr a été montrée dans une série de 20 patients atteints de tumeurs ORL (Börjesson et coll., 2006). Une spécificité de 100% mais surtout une sensibilité supérieure à la TEP au FDG (85% versus 62%) ont été obtenues.

Les couples/paires d'isotopes béta+/béta- ($^{124}/^{131}\text{I}$, $^{86}/^{90}\text{Y}$, $^{64}/^{67}\text{Cu}$) offrent la possibilité d'une imagerie tumorale en immunoTEP avec l'anticorps utilisé pour la thérapie avec les mêmes paramètres pharmacocinétiques. Cela devrait permettre une

plus grande précision dans les calculs de dosimétrie avant traitement et fournir des informations sur l'expression antigénique des tumeurs qui seraient complémentaires aux informations métaboliques du ^{18}F FDG-TEP. C'est dans cette problématique que nous avons positionné notre étude d'immunoTEP. En effet, elle fait suite à une étude de RIT avec le même modèle animal avec le B-B4 marqué à l'iode 131 (Rousseau et coll., 2011).

Dans le cancer du sein, plusieurs équipes ont évalué des approches d'immunoTEP avec différents anticorps et radioéléments pour l'imagerie de Her2. Des minibodies et des scFv-Fc marqués ^{64}Cu ont été comparés dans des modèles animaux de carcinomes mammaires (Schuhmacher et coll., 2001 ; Dijkers et coll., 2009). Des études animales ont également évalué le trastuzumab marqué au ^{89}Zr (Baum et coll., 2010). Les études de biodistribution montraient une fixation élevée de l'anticorps ^{89}Zr -trastuzumab dans les tumeurs Her2 positives ($33,4 \pm 7,6$ de l'activité injectée par gramme de tissu à 6 jours). D'autres ont utilisé l'immunoTEP dans les tumeurs Her2 positives mais cette fois comme outil d'évaluation thérapeutique d'un inhibiteur de Hsp90 (Geldamicine) (Holland et coll., 2010). Ils ont pu montrer que l'immunoTEP au ^{89}Zr -DFO-Trastuzumab pouvait mettre en évidence une diminution de l'expression Her2 des tumeurs après traitement, de manière transitoire pendant 24 à 48h. Le ^{89}Zr -DFO-Trastuzumab pourrait donc être un traceur potentiel, hautement spécifique, d'évaluation de l'impact sur le phénotype tumoral de ce type de traitement. En clinique, l'équipe de Baum a évalué le ciblage de Her2 avec des Affibodies marquées au Gallium 68 avec du DOTA (ABY-002) (Kaplan et coll., 2008). Les auteurs concluaient que ABY-002 avait le potentiel pour localiser des métastases *in vivo*, tout en apportant des informations complémentaires par rapport à l'imagerie conventionnelle, permettant de déterminer le statut Her2 de façon non invasive sans biopsie. L'ensemble de ces données placent l'immunoTEP comme une imagerie de « biodistribution *in vivo* » tant au diagnostic que lors de l'évaluation thérapeutique. Elle permet d'éviter le sacrifice de l'animal ou les biopsies itératives et les résultats pré-cliniques et cliniques publiés dans le cancer du sein sont encourageants. Les tumeurs mammaires triple-négatives, de pronostic péjoratif (Barbareschi et coll., 2003), constituent un défi tant diagnostique que thérapeutique. Le récepteur de l'IGF-1, exprimé chez 36% des tumeurs mammaires TN, est une nouvelle cible pour le

traitement de ces tumeurs avec des anticorps anti-IGF-1R. Heskamp *et al.* ont montré récemment que l'anticorps anti-IGF-1R R1507 marqué au ^{89}Zr était un traceur innovant pour déterminer de façon non invasive l'expression *in vivo* de IGF-1R dans ces cancers mammaires, pouvant dans le futur permettre de sélectionner les patientes pour cette thérapie ciblée (Heskamp et coll., 2010). L'étude d'imagerie que nous avons menée s'inscrit dans une démarche similaire : un premier travail a montré l'efficacité et la toxicité acceptable de la RIT au ^{131}I -B-B4 dans un modèle de cancer du sein triple négatif. Dans un deuxième temps, il nous a semblé intéressant, d'une part de valider l'immunoTEP au ^{124}I -B-B4 ciblant le CD138 dans le même modèle de cancer du sein triple négatif et d'autre part de positionner cet examen par rapport aux autres traceurs TEP (FDG et FLT) utilisés au diagnostic et en suivi thérapeutique.

La lignée MDA-MB-468, utilisée dans notre étude, exprime relativement peu de sites antigéniques CD138 par cellule ($1,19.10^4 \pm 9,27.10^2$ antigènes par cellule), les images d'iTEP ont montré un contraste favorable à la mise en évidence de la tumeur greffée jusqu'à 192 h après l'injection. Cela a été confirmé par la quantification avec un rapport T/M favorable de $12,17 \pm 0,62$ à 96 h. Il semble donc que la faible expression tumorale antigénique ne soit pas un facteur limitant, puisqu'une étude réalisée avec un diabody radio-marqué à l'iode 124 a montré la persistance d'une concentration élevée d'AcM radio-marqué dans la circulation sanguine jusqu'à 96 h, avec une quantité d'AcM peu différente dans le sang et la tumeur, ce qui est un avantage pour atteindre des cibles antigéniques peu exprimées comme ici avec la lignée MDA-MB-468 (Robinson et coll., 2005). Une limite de l'étude a été l'immunoréactivité du ^{124}I -B-B4 assez basse à $48,7\% \pm 3,3$. Le radio-marquage devra donc être optimisé, mais la qualité des images d'immunoTEP était satisfaisante malgré l'immunoréactivité modérée. Robinson et al. avaient testé 2 méthodes de radio-marquage à l'iode d'un diabody, et l'une avait également une immunoréactivité entre 30 et 40% (Robinson et coll., 2005). Ils décrivaient une incidence sur les données de biodistribution avec une diminution proportionnelle du pourcentage de l'activité injectée par gramme de tumeur (%ID/g). Nous avons aussi constaté une nette différence entre 14% %ID/g dans la tumeur à 24 h mesuré lors d'une étude de biodistribution avec B-B4 marqué à l'iode 125 (Rousseau et coll., 2011) et 4,74% à 24 h obtenus ici avec le ^{124}I -B-B4. La différence constatée entre

les 2 marquages pourrait aussi s'expliquer par une dégradation au fil du temps de l'anticorps B-B4 car les essais d'immunoTEP et l'étude de biodistribution au ^{124}I -B-B4 ont été très postérieurs aux études réalisées avec ^{125}I -B-B4.

L'analyse des cinétiques de fixation du ^{124}I -B-B4 extraites des données des images d'immunoTEP et des données de biodistribution ont montré une bonne correspondance pour les organes individualisables sur les images de microTDM (cœur, foie et tumeur). Seule la tumeur demande un compartiment supplémentaire pour ajuster les valeurs expérimentales, ce qui montre que c'est seulement dans la tumeur que l'anticorps se fixe. L'activité mesurée dans le cœur et le foie évolue avec la même cinétique qui est celle de l'activité sanguine. L'activité présente dans ces deux organes est donc en échange rapide avec celle du sang. Il faut tout de même noter que la valeur absolue des activités est différente entre les deux mesures (images et dissections), mais cette différence peut s'expliquer par une différence de contenu sanguin des tissus entre l'animal vivant et après sacrifice et dissection. Le fait que cette différence soit plus grande pour le cœur que pour le foie va dans ce sens. Des études complémentaires vont être réalisées pour préciser ces points, mais il n'est pas exclu que l'imagerie soit en fait plus représentative que les biodistributions pour estimer l'irradiation d'un organe, lorsque l'activité circulante reste élevée, comme c'est le cas avec les anticorps marqués. Si l'on peut démontrer que les données d'imagerie peuvent remplacer les données de biodistribution, on pourra diminuer sensiblement le nombre d'animaux sacrifiés tout en gardant une bonne valeur statistique des données grâce à des études longitudinales. La variabilité interindividuelle et les sources d'erreurs externes ne pourront cependant être prises en compte que par une répétition des études sur plusieurs animaux. Dans la présente étude, le nombre d'animaux soumis à la dissection est très faible (un seul par temps) de même que le nombre d'animaux soumis à l'imagerie (de 3 aux temps courts à un seul aux temps plus longs). La comparaison des résultats d'imagerie et de dissection ne peut donc pas être poussée plus loin pour l'instant.

La littérature concernant le cancer du sein et la TEP est relativement abondante surtout à propos du FDG et récemment plusieurs équipes se sont intéressées au groupe des patientes porteuses d'un phénotype triple négatif. Il a été montré que ce phénotype présentait une avidité importante pour le FDG et qu'il existait une corrélation entre le

degré de prolifération et l'hypermétabolisme constaté en imagerie (Basu et coll., 2008 ; Tchou et coll., 2010 ; Wang et coll., 2011). En préclinique, en revanche, il a été rapporté depuis longtemps des difficultés à retrouver les mêmes performances (Amano et coll., 1998), avec des rapports T/M (Tumeur/Muscle) avec le FDG de $0,60 \pm 0,07$ dans le cancer du sein. Dans notre étude, le rapport trouvé est légèrement meilleur ($1,67 \pm 0,24$) mais l'image est peu convaincante et on constate un hypermétabolisme musculaire significatif. Les souris étaient bien à jeun depuis la veille au soir mais n'ont pas été anesthésiées à l'injection du FDG et donc ont maintenu une activité physique jusqu'à l'acquisition des images ce qui n'est pas le cas chez l'homme, qui est au repos pendant une heure dès l'injection. Cette activité, pendant la phase d'incorporation tumorale du FDG, doit probablement participer à l'hypermétabolisme musculaire et donc à une moins bonne discrimination tumeur-muscle.

La FLT, traceur de la prolifération tumorale, est beaucoup moins utilisé dans le cancer du sein que le FDG en dehors de la prédiction de la réponse thérapeutique (Chalkidou et coll., 2012 ; Contractor et coll., 2012). Chez l'homme, une corrélation a été retrouvée entre la captation de FLT mesurée par SUV et l'activité proliférative des tumeurs malignes, mesurée par le Ki67 (Oude Munnink et coll., 2009). La lignée cellulaire (MDA MB 468) utilisée dans notre étude exprime très fortement Ki67, mesuré à 90%, et la fixation de la FLT sur la tumeur greffée a été meilleure que celle observée avec le FDG. Cela a été confirmé par un rapport T/M de $5,28 \pm 0,49$ qui est resté toutefois bien inférieur à celui mesuré avec le ^{124}I -B-B4.

Les perspectives d'utilisation de l'immunoTEP sont nombreuses et la littérature le traduit bien par la multiplication des études précliniques évaluant ce type d'imagerie depuis 2010 dans divers modèles tumoraux, avec différents AcM mais aussi avec des molécules de plus petite taille comme les diabodies, minibodies et affibodies. Des applications diagnostiques sont envisagées pour la détection et la caractérisation tumorale avant traitement ou au stade de maladie résiduelle, pour la stadification, l'étude des marqueurs pronostiques à l'échelle du corps entier et l'orientation d'une biopsie. L'immuno-TEP devrait permettre également d'évaluer et de quantifier l'expression et l'accessibilité d'une cible *in vivo* et de mieux sélectionner les patients pour une thérapie ciblée.

En conclusion, ce travail confirme la faisabilité de l'approche d'immunoTEP ciblant le CD138 avec le ^{124}I -B-B4 dans un modèle de carcinome mammaire triple négatif, avec des intérêts potentiels diagnostiques, pronostiques et pré-thérapeutiques avant la RIT.

CHAPITRE IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Le cancer du sein triple négatif, caractérisé par l'absence d'expression des récepteurs hormonaux et de Her2, est associé à un mauvais pronostic avec un taux de rechutes élevé. La tumeur étant réfractaire aux traitements classiques, de nouvelles thérapies, notamment ciblées, doivent être développées.

Le syndecan-1 est une cible intéressante, son expression étant associée à l'absence de récepteurs hormonaux et à un index de prolifération Ki67 élevé traduisant un phénotype agressif. Exprimée à la surface des cellules tumorales et dans le stroma, la cible apparaît pertinente pour une approche de RIT avec un anticorps monoclonal capable de cibler les deux formes d'expression cellulaire. Notre étude a montré l'efficacité de la RIT avec l'anticorps ¹³¹I-B-B4 dirigé contre le syndecan-1, dans un modèle murin de cancer du sein triple négatif métastatique. La RIT peut donc être considérée comme une option thérapeutique prometteuse pour cette forme de cancer de mauvais pronostic.

Par ailleurs, des émetteurs de positons innovants comme l'¹²⁴I étant aujourd'hui disponibles, le syndecan-1 peut aussi être considéré comme une cible intéressante pour une approche d'immunoTEP, stratégie non invasive pour caractériser l'expression antigénique tumorale à l'échelle du corps entier et obtenir un diagnostic moléculaire fiable. Notre étude préclinique a montré la faisabilité de l'approche d'immunoTEP avec le ¹²⁴I-B-B4 pour les carcinomes mammaires triples négatifs, avec des intérêts potentiels diagnostiques, pronostiques et pré-thérapeutiques.

Nos perspectives sont de transférer l'approche d'immunoTEP et de RIT en clinique chez des patientes atteintes de cancer du sein métastatique. Aucun anticorps anti-syndécan-1 n'étant aujourd'hui disponible pour une utilisation clinique, nous avons choisi de cibler l'ACE qui est un autre antigène intéressant exprimé dans 40 à 60% des carcinomes mammaires. Une étude pilote d'immunoTEP va débuter, évaluant l'AcBs recombinant humanisé trivalent anti-ACE TF2 et le peptide histamine IMP-288 marqué au ⁶⁸Ga chez des patientes atteintes de carcinomes mammaires métastatiques. L'IMP-288 pouvant également être marqué aisément avec des émetteurs de particules bêta- comme l'⁹⁰Y, une étude de RIT préciblée sera proposée dans un second temps.

CHAPITRE V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Akabani G, Cokgor I, Coleman RE, González Trotter D, Wong TZ, Friedman HS, Friedman AH, Garcia-Turner A, Herndon JE, DeLong D, McLendon RE, Zhao XG, Pegram CN, Provenzale JM, Bigner DD, Zalutsky MR. Dosimetry and dose-response relationships in newly diagnosed patients with malignant gliomas treated with iodine-131-labeled anti-tenascin monoclonal antibody 81C6 therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000; 46:947-58.
2. Akabani G, Carlin S, Welsh P, Zalutsky MR. In vitro cytotoxicity of ²¹¹At-labeled trastuzumab in human breast cancer cell lines: Effect of specific activity and HER2 receptor heterogeneity on survival fraction. *Nucl Med Biol* 2006;33:333–47.
3. Alastair JJW: Aromatase inhibitors in breast cancer. *New Eng J Med* 2003; 348: 5544-5552.
4. Alexander CM, Reichsman F, Hinkes MT, Lincecum J, Becker KA, Cumberledge S, Bernfield M. Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice. *Nat Genet.* 2000;25:329-32.
5. Alexopoulou AN, Mulhaupt HA, Couchman JR. Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39:505-28.
6. Allen BJ, Raja C, Rizvi S, Li Y, Tsui W, Zhang D, et al. Targeted alpha therapy for cancer. *Phys Med Biol* 2004;49:3703–3712.
7. Amano S, Inoue T, Tomiyoshi K, Ando T, Endo K. In vivo comparison of PET and SPECT radiopharmaceuticals in detecting breast cancer. *J Nucl Med.* 1998;39:1424-7.
8. Andersen NF, Standal T, Nielsen JL, Heickendorff L, Borset M, Sørensen FB, Abildgaard N. Syndecan-1 and angiogenic cytokines in multiple myeloma: correlation with bone marrow angiogenesis and survival. *Br J Haematol.* 2005;128:210-7.
9. Anderson KC, Dalton WS. Synopsis of a research roundtable presented on cell signaling in myeloma: regulation of growth and apoptosis--opportunities for new drug discovery. *Mol Cancer Ther.* 2002;1:1361-5.
10. Andersson H, Cederkrantz E, Bäck T, et al. Intraperitoneal α -Particle Radioimmunotherapy of Ovarian Cancer Patients: Pharmacokinetics and Dosimetry of ²¹¹At-MX35 F(ab₉)₂—A Phase I Study. *Nucl Med* 2009; 50:1153–1160.
11. Annunziata CM, O'Shaughnessy J. Poly (ADP-ribose) polymerase as a novel therapeutic target in cancer. *Clin Cancer Res.* 2010; 16:4517-26.
12. Anttonen A, Heikkilä P, Kajanti M, Jalkanen M, Joensuu H. High syndecan-1 expression is associated with favourable outcome in squamous cell lung carcinoma treated with radical surgery. *Lung Cancer.* 2001;32:297-305.
13. Asundi VK, Keister BF, Stahl RC, Carey DJ. Developmental and cell-type-specific expression of cell surface heparan sulfate proteoglycans in the rat heart. *Exp Cell Res.* 1997;230:145-53.
14. Baba F, Swartz K, van Buren R, Eickhoff J, Zhang Y, Wolberg W, Friedl A. Syndecan-1 and syndecan-4 are overexpressed in an estrogen receptor-negative, highly proliferative breast carcinoma subtype. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;98:91-8.
15. Bale WF, Spar IL. Studies directed toward the use of antibodies as carriers of radioactivity for therapy. *Adv Biol Med Phys.* 1957;5:285-356.

16. Bander NH, Milowsky MI, Nanus DM, Kostakoglu L, Vallabhajosula S, Goldsmith SJ. Phase I trial of ¹⁷⁷lutetium-labeled J591, a monoclonal antibody to prostate-specific membrane antigen, in patients with androgen-independent prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2005; 23:4591–4601.
17. Bando H. Vascular endothelial growth factor and bevacitumab in breast cancer. *Breast Cancer*. 2007;14(2):163-73.
18. Barbareschi M, Maisonneuve P, Aldovini D, Cangi MG, Pecciarini L, Angelo Mauri F, Veronese S, Caffo O, Lucenti A, Palma PD, Galligioni E, Doglioni C. High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis. *Cancer*. 2003;98:474-83.
19. Barbet J, Kraeber-Bodéré F, Chatal JF. What can be expected from nuclear medicine tomorrow? *Cancer Biother Radiopharm*. 2008; 23:483-504.
20. Bass MD, Humphries MJ. Cytoplasmic interactions of syndecan-4 orchestrate adhesion receptor and growth factor receptor signalling. *Biochem J*. 2002;368:1-15.
21. Basu S, Chen W, Tchou J, Mavi A, Cermik T, Czerniecki B, Schnall M, Alavi A. Comparison of triple-negative and estrogen receptor-positive/progesterone receptor-positive/HER2-negative breast carcinoma using quantitative fluorine-18 fluorodeoxyglucose/positron emission tomography imaging parameters: a potentially useful method for disease characterization. *Cancer*. 2008;112:995-1000.
22. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer*. 2007; 109:1721-8.
23. Baum RP, Prasad V, Müller D, Schuchardt C, Orlova A, Wennborg A, Tolmachev V, Feldwisch J. Molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors in breast cancer patients using synthetic ¹¹¹In- or ⁶⁸Ga-labeled affibody molecules. *J Nucl Med*. 2010;51:892-897.
24. Bayer-Garner IB, Sanderson RD, Dhodapkar MV, Owens RB, Wilson CS. Syndecan-1 (CD138) immunoreactivity in bone marrow biopsies of multiple myeloma: shed syndecan-1 accumulates in fibrotic regions. *Mod Pathol*. 2001;14:1052-8.
25. Beauvais DM, Rapraeger AC. Syndecan-1-mediated cell spreading requires signaling by α v β 3 integrins in human breast carcinoma cells. *Exp Cell Res*. 2003;286:219-32.
26. Beauvais DM, Rapraeger AC. Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004;2:3.
27. Behr TM, Sharkey RM, Sgouros G, Blumenthal RD, Dunn RM, Kolbert K, Griffiths GL, Siegel JA, Becker WS, Goldenberg DM. Overcoming the nephrotoxicity of radiometal-labeled immunoconjugates: improved cancer therapy administered to a nude mouse model in relation to the internal radiation dosimetry. *Cancer*. 1997; 80:2591-610.
28. Behr TM, Memtsoudis S, Sharkey RM, Blumenthal RD, Dunn RM, Gratz S, Wieland E, Nebendahl K, Schmidberger H, Goldenberg DM, Becker W. Experimental studies on the role of antibody fragments in cancer radio-

- immunotherapy: Influence of radiation dose and dose rate on toxicity and anti-tumor efficacy. *Int J Cancer*. 1998; 77:787-95.
29. Bellet D, Dangles-Marie V. [Humanized antibodies as therapeutics]. *Med Sci (Paris)*. 2005; 21:1054-62.
 30. Bernardeau K, Gouard S, David G, Ruellan AL, Devys A, Barbet J, Bonneville M, Chérel M, Davodeau F. Assessment of CD8 involvement in T cell clone avidity by direct measurement of HLA-A2/Mage3 complex density using a high-affinity TCR like monoclonal antibody. *Eur J Immunol*. 2005;35:2864-75.
 31. Bernfield M, Götte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:729-77.
 32. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Esterni B, Hermitte F, Viens P, Birnbaum D. How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer*. 2008;123:236-40.
 33. Blumenthal RD, Sharkey RM, Haywood L, Natale AM, Wong GY, Siegel JA, Kennel SJ, Goldenberg DM. Targeted therapy of athymic mice bearing GW-39 human colonic cancer micrometastases with ¹³¹I-labeled monoclonal antibodies. *Cancer Res*. 1992; 52:6036-44.
 34. Bodet-Milin C, Salaun PY, Oudoux A, Kraeber-Bodéré F, Radio-immunotherapy in clinical practice. *Médecine Nucléaire*. 2008;32: 254–257.
 35. Boerman OC, Oyen WJ. Immuno-PET of cancer: a revival of antibody imaging. *J Nucl Med*. 2011;52:1171-2.
 36. Börjesson PK, Jauw YW, Boellaard R, de Bree R, Comans EF, Roos JC, Castellijns JA, Vosjan MJ, Kummer JA, Leemans CR, Lammertsma AA, van Dongen GA. Performance of immuno-positron emission tomography with zirconium-89-labeled chimeric monoclonal antibody U36 in the detection of lymph node metastases in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006;12:2133-2140.
 37. Bosslet K, Steinsträsser A, Schwarz A, Harthus HP, Lüben G, Kuhlmann L, Sedlacek HH. Quantitative considerations supporting the irrelevance of circulating serum CEA for the immunoscintigraphic visualization of CEA expressing carcinomas. *Eur J Nucl Med*. 1988; 14:523-8.
 38. Bostwick DG, Pacelli A, Blute M, Roche P, Murphy GP. Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: A study of 184 cases. *Cancer*. 1998; 82:2256–2261.
 39. Botha JL, Bray F, Sankila R, Parkin DM. Breast cancer incidence and mortality trends in 16 European countries. *Eur J Cancer*. 2003;39:1718-29.
 40. Bray F, McCarron P, Parkin DM. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Res*. 2004;6:229-39.
 41. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol*. 2005; 23:7350-60.
 42. Brouwers AH, van Eerd JE, Frielink C, Oosterwijk E, Oyen WJ, Corstens FH, Boerman OC. Optimization of radioimmunotherapy of renal cell carcinoma: labeling of monoclonal antibody cG250 with ¹³¹I, ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu, or ¹⁸⁶Re. *J Nucl Med*. 2004; 45:327-37.
 43. Brown JM, Giaccia AJ. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res*. 1998; 58:1408-16.

44. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, Helleday T. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*. 2005; 434:913-7.
45. Buchegger F, Pèlegri A, Hardman N, Heusser C, Lukas J, Dolci W, Mach JP. Different behaviour of mouse-human chimeric antibody F(ab')₂ fragments of IgG1, IgG2 and IgG4 sub-class in vivo. *Int J Cancer*. 1992; 50:416-22.
46. Buchegger F, Press OW, Delaloye AB, Ketterer N. Radiolabeled and native antibodies and the prospect of cure of follicular lymphoma. *Oncologist*. 2008; 13:657-67.
47. Bui C. Exploration des enzymes de biosynthèse des protéoglycanes et leurs altérations lors de pathologies articulaires. Th Doctorat, Discipline Sciences de la vie et de la santé, Nancy 1 ; 2009,pp 1-150.
48. Burbach BJ, Friedl A, Mundhenke C, Rapraeger AC. Syndecan-1 accumulates in lysosomes of poorly differentiated breast carcinoma cells. *Matrix Biol*. 2003;22:163-77.
49. Burton MA, Gray BN, Coletti A. Effect of angiotensin II on blood flow in the transplanted sheep squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1988; 24:1373-6.
50. Cagnoni PJ, Ceriani RL, Cole WC, et al: Phase I study of high-dose radioimmunotherapy with 90-Y-hu-BrE-3 followed by autologous stem cell support (ASCM) in patients with metastatic breast cancer. *Cancer Biopharm* 1998; 13:328 (abs).
51. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, Ollila DW, Sartor CI, Graham ML, Perou CM. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res*. 2007; 13:2329-34.
52. Carey DJ. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J*. 1997;327:1-16.
53. Carrasquillo JA, Pandit-Taskar N, O'Donoghue JA, Humm JL, Zanzonico P, Smith-Jones PM, Divgi CR, Pryma DA, Ruan S, Kemeny NE, Fong Y, Wong D, Jaggi JS, Scheinberg DA, Gonen M, Panageas KS, Ritter G, Jungbluth AA, Old LJ, Larson SM. (124)I-huA33 antibody PET of colorectal cancer. *J Nucl Med*. 2011;52:1173-80.
54. Chacón RD, Costanzo MV. Triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12 Suppl 2:S3
55. Chalkidou A, Landau DB, Odell EW, Cornelius VR, O'Doherty MJ, Marsden PK. Correlation between Ki-67 immunohistochemistry and 18F-Fluorothymidine uptake in patients with cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2012;31.
56. Chang Z, Meyer K, Rapraeger AC, Friedl A. Differential ability of heparan sulfate proteoglycans to ass *Exp Cell Res*. 2003 Jun 10;286(2):219-32.
57. Charnaux N, Brule S, Hamon M, Chaigneau T, Saffar L, Prost C, Lievre N, Gattegno L. Syndecan-4 is a signaling molecule for stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/ CXCL12. *FEBS J*. 2005;272:1937-51.
58. Chatal JF, Saccavini JC, Gestin JF, Thédrez P, Curtet C, Kremer M, Guerreau D, Nolibé D, Fumoleau P, Guillard Y. Biodistribution of indium-111-labeled OC 125 monoclonal antibody intraperitoneally injected into patients operated on for ovarian carcinomas. *Cancer Res*. 1989; 49:3087-94.

59. Chatal JF, Campion L, Kraeber-Bodéré F, Bardet S, Vuillez JP, Charbonnel B, Rohmer V, Chang CH, Sharkey RM, Goldenberg DM, Barbet J; French Endocrine Tumor Group. Survival improvement in patients with medullary thyroid carcinoma who undergo pretargeted anti-carcinoembryonic-antigen radioimmunotherapy: a collaborative study with the French Endocrine Tumor Group. *J Clin Oncol.* 2006;24:1705-11.
60. Chatal JF, Davodeau F, Cherel M, Barbet J. Different ways to improve the clinical effectiveness of radioimmunotherapy in solid tumors. *J Cancer Res Ther.* 2009; 5 Suppl 1:S36-40.
61. Chen L, Klass C, Woods A. Syndecan-2 regulates transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem.* 2004;279:15715-8.
62. Chérel M, Davodeau F, Kraeber-Bodéré F, Chatal JF. Current status and perspectives in alpha radioimmunotherapy. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2006; 50:322-9.
63. Cherel M, Gouard S, Gaignerie A, Gaschet J, Bigot-Corbel E, Faivre-Chauvet A, et al. Targeting the CD138 antigen for the treatment of multiple myeloma with Bismuth-213. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2009;36 (Suppl 2):S194-S233 (abstract).
64. Chin K, DeVries S, Fridlyand J, Spellman PT, Roydasgupta R, Kuo WL, Lapuk A, Neve RM, Qian Z, Ryder T, Chen F, Feiler H, Tokuyasu T, Kingsley C, Dairkee S, Meng Z, Chew K, Pinkel D, Jain A, Ljung BM, Esserman L, Albertson DG, Waldman FM, Gray JW. Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell.* 2006; 10:529-41.
65. 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; 6:3621-8. (A)
66. Clarke K, Lee FT, Brechbiel MW, Smyth FE, Old LJ, Scott AM. In vivo biodistribution of a humanized anti-Lewis Y monoclonal antibody (hu3S193) in MCF-7 xenografted BALB/c nude mice. *Cancer Res.* 2000; 60:4804-11. (B)
67. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol.* 1999; 17:2639-48.
68. Colcher D, Minelli MF, Roselli M, Muraro R, Simpson-Milenic D, Schlom J. Radioimmunolocalization of human carcinoma xenografts with B72.3 second generation monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 1988; 48:4597-603.
69. Colcher D, Pavlinkova G, Beresford G, Booth BJ, Choudhury A, Batra SK. Pharmacokinetics and biodistribution of genetically-engineered antibodies. *Q J Nucl Med.* 1998; 42:225-41.
70. Contractor K, Aboagye EO, Jacob J, Challapalli A, Coombes RC, Stebbing J. Monitoring early response to taxane therapy in advanced breast cancer with circulating tumor cells and [(18)F] 3'-deoxy-3'-fluorothymidine PET: a pilot study. *Biomark Med.* 2012;6:231-3.

71. Couturier O, Faivre-Chauvet A, Filippovich IV, Thedrez P, Sai-Maurel C, Bardies M, et al. Validation of ²¹³Bi-alpha radioimmunotherapy for multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 1999;5(10 Suppl):3165s-3170s.
72. Couturier O, Supiot S, Degraef-Mougin M, Faivre-Chauvet A, Carlier T, Chatal J-F, et al. Cancer radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005;32:601–14.
73. Crow DM, Williams L, Colcher D, Wong JY, Raubitschek A, Shively JE. Combined radioimmunotherapy and chemotherapy of breast tumors with Y-90-labeled anti-Her2 and anti-CEA antibodies with taxol. *Bioconjug Chem.* 2005; 16:1117-25.
74. Day RM, Mitchell TJ, Knight SC, Forbes A. Regulation of epithelial syndecan-1 expression by inflammatory cytokines. *Cytokine.* 2003;21:224-33.
75. Dehdashti F, Mortimer JE, Trinkaus K, Naughton MJ, Ellis M, Katzenellenbogen JA, Welch MJ, Siegel BA. PET-based estradiol challenge as a predictive biomarker of response to endocrine therapy in women with estrogen-receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;113:509-17.
76. De Laurentiis M, Cianniello D, Caputo R, Stanzione B, Arpino G, Cinieri S, Lorusso V, De Placido S. Treatment of triple negative breast cancer (TNBC): current options and future perspectives. *Cancer Treat Rev.* 2010; 36 Suppl 3:S80-6.
77. DeNardo G, DeNardo S, Kukis D, Diril H, Suey C, Meares C. Strategies for enhancement of radioimmunotherapy. *Int J Rad Appl Instrum B.* 1991; 18:633-40.
78. DeNardo SJ, Mirick GR, Kroger LA, O'Grady LF, Erickson KL, Yuan A, Lamborn KR, Hellstrom I, Hellstrom KE, DeNardo GL. The biologic window for chimeric L6 radioimmunotherapy. *Cancer.* 1994; 73:1023-32.
79. DeNardo SJ, Gumerlock PH, Winthrop MD, Mack PC, Chi SG, Lamborn KR, Shen S, Miers LA, deVere White RW, DeNardo GL. Yttrium-90 chimeric L6 therapy of human breast cancer in nude mice and apoptosis-related messenger RNA expression. *Cancer Res.* 1995; 55:5837s-5841s.
80. DeNardo SJ, Kramer EL, O'Donnell RT, Richman CM, Salako QA, Shen S, Noz M, Glenn SD, Ceriani RL, DeNardo GL. Radioimmunotherapy for breast cancer using indium-111/yttrium-90 BrE-3: results of a phase I clinical trial. *J Nucl Med.* 1997;38:1180-5.
81. DeNardo SJ: Radioimmunotherapy for breast cancer. Systemic tumor targeted irradiation. *Adv Oncol.* 1999; 15: 23-29.
82. DeNardo SJ, Yuan A, Richman C, et al: Therapeutic index enhancement by DOTA peptide linkage in ¹¹¹In/⁹⁰Y DOTA-Lym-1 and m170 MAbs in clinical trials. *J Nucl Med.* 2002; 43:117P.
83. DeNardo GL, Schlom J, Buchsbaum DJ, et al. Rationales, evidence and design considerations for fractionated radioimmunotherapy. *Cancer.* 2002;94:1332-1348.
84. DeNardo SJ. Radioimmunodetection and therapy of breast cancer. *Semin Nucl Med.* 2005; 35:143-51.
85. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:4429-34.

86. Dent R, Hanna WM, Trudeau M, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2009; 115:423-8.
87. Derksen PW, Keehnen RM, Evers LM, van Oers MH, Spaargaren M, Pals ST. Cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates hepatocyte growth factor binding and promotes Met signaling in multiple myeloma. *Blood.* 2002;99:1405-10.
88. Dhesy-Thind B, Pritchard KI, Messersmith H, O'Malley F, Elavathil L, Trudeau M. HER2/neu in systemic therapy for women with breast cancer: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat.* 2008; 109:209-29.
89. Dhodapkar MV, Kelly T, Theus A, Athota AB, Barlogie B, Sanderson RD. Elevated levels of shed syndecan-1 correlate with tumour mass and decreased matrix metalloproteinase-9 activity in the serum of patients with multiple myeloma. *Br J Haematol.* 1997;99:368-71.
90. Ding K, Lopez-Burks M, Sánchez-Duran JA, Korc M, Lander AD. Growth factor-induced shedding of syndecan-1 confers glypican-1 dependence on mitogenic responses of cancer cells. *J Cell Biol.* 2005;171:729-38.
91. Di Leo A, Gomez HL, Aziz Z, Zvirbulis Z, Bines J, Arbushites MC, Guerrero SF, Koehler M, Oliva C, Stein SH, Williams LS, Dering J, Finn RS, Press MF. Phase III, double-blind, randomized study comparing lapatinib plus paclitaxel with placebo plus paclitaxel as first-line treatment for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2008; 26:5544-52.
92. Diaz LK, Cryns VL, Symmans WF, Sneige N. Triple negative breast carcinoma and the basal phenotype: from expression profiling to clinical practice. *Adv Anat Pathol.* 2007; 14:419-30.
93. Dijkers EC, de Vries EG, Kosterink JG, Brouwers AH, Lub-de Hooge MN. Immunoscintigraphy as potential tool in the clinical evaluation of HER2/neu targeted therapy. *Curr Pharm Des.* 2008;14:3348-62.
94. Dijkers EC, Kosterink JG, Rademaker AP, Perk LR, van Dongen GA, Bart J, de Jong JR, de Vries EG, Lub-de Hooge MN. Development and characterization of clinical-grade ⁸⁹Zr-trastuzumab for HER2/neu immunoPET imaging. *J Nucl Med* 2009;50:974-981.
95. Dijkers EC, Oude Munnink TH, Kosterink JG, Brouwers AH, Jager PL, de Jong JR, van Dongen GA, Schröder CP, Lub-de Hooge MN, de Vries EG. Biodistribution of ⁸⁹Zr-trastuzumab and PET imaging of HER2-positive lesions in patients with metastatic breast cancer. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;87:586-92.
96. Divgi CR, Pandit-Taskar N, Jungbluth AA, Reuter VE, Gönen M, Ruan S, Pierre C, Nagel A, Pryma DA, Humm J, Larson SM, Old LJ, Russo P. Preoperative characterization of clear-cell renal carcinoma using iodine-124-labelled antibody chimeric G250 (¹²⁴I-cG250) and PET in patients with renal masses: a phase I trial. *Lancet Oncol* 2007;8:304-310.
97. van Dongen GA, Visser GW, Lub-de Hooge MN, de Vries EG, Perk LR. Immuno-PET: a navigator in monoclonal antibody development and applications. *Oncologist* 2007;12:1379-1389.
98. Elenius K, Määttä A, Salmivirta M, Jalkanen M. Growth factors induce 3T3 cells to express bFGF-binding syndecan. *J Biol Chem.* 1992;267:6435-41.
99. Ellis P, Barrett-Lee P, Johnson L, Cameron D, Wardley A, O'Reilly S, Verrill M, Smith I, Yarnold J, Coleman R, Earl H, Canney P, Twelves C, Poole C,

- Bloomfield D, Hopwood P, Johnston S, Dowsett M, Bartlett JM, Ellis I, Peckitt C, Hall E, Bliss JM; TACT Trial Management Group; TACT Trialists. Sequential docetaxel as adjuvant chemotherapy for early breast cancer (TACT): an open-label, phase III, randomised controlled trial. *Lancet*. 2009; 373:1681-92.
100. Endo K, Takino T, Miyamori H, Kinsen H, Yoshizaki T, Furukawa M, Sato H. Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. *J Biol Chem*. 2003;278:40764-70.
101. Esteban JM, Felder B, Ahn C, Simpson JF, Battifora H, Shively JE. Prognostic relevance of carcinoembryonic antigen and estrogen receptor status in breast cancer patients. *Cancer*. 1994; 74:1575-83.
102. Fand I, Sharkey RM, McNally WP, Brill AB, Som P, Yamamoto K, Primus FJ, Goldenberg DM. Quantitative whole-body autoradiography of radiolabeled antibody distribution in a xenografted human cancer model. *Cancer Res*. 1986; 46:271-7.
103. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*. 2005; 434:917-21.
104. Fears CY, Woods A. The role of syndecans in disease and wound healing. *Matrix Biol*. 2006 ;25:443-56.
105. Fitzgerald ML, Wang Z, Park PW, Murphy G, Bernfield M. Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J Cell Biol*. 2000;148:811-24.
106. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, Mortimer P, Swaisland H, Lau A, O'Connor MJ, Ashworth A, Carmichael J, Kaye SB, Schellens JH, de Bono JS. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med*. 2009; 361:123-34.
107. Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Bégin LR, Goffin JR, Wong N, Trudel M, Akslen LA. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003; 95:1482-5.
108. Foulkes WD, Brunet JS, Stefansson IM, Straume O, Chappuis PO, Bégin LR, Hamel N, Goffin JR, Wong N, Trudel M, Kapusta L, Porter P, Akslen LA. The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high/p27 low/p53+/glomeruloid-microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1-related breast cancer. *Cancer Res*. 2004; 64:830-5.
109. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2010; 363:1938-48.
110. Fowler JF. Radiobiological aspects of low dose rates in radioimmunotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990 ; 18 : 1261-1269.
111. Fraker PJ, Speck JC Jr. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6adiphenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun* 1978, 80:849-857.
112. Freres P, Collignon J, Gennigens C, Scagnol I, Rorive A, Barbeaux A, Coucke PA, Jérusalem G. "Triple negative" breast cancer". *Rev Med Liege*. 2010; 65:120-6.

113. Fuki IV, Meyer ME, Williams KJ. Transmembrane and cytoplasmic domains of syndecan mediate a multi-step endocytic pathway involving detergent-insoluble membrane rafts. *Biochem J.* 2000;351:607-612.
114. Gallagher JT & Lyon M; Proteoglycans : structure, biology and molecular interactions. Iozzo RV., Eds. Marcel Dekker New York, pp27-60.
115. Gallowitsch HJ, Kresnik E, Gasser J, Kumnig G, Igerc I, Mikosch P, Lind P. F-18 fluorodeoxyglucose positron-emission tomography in the diagnosis of tumor recurrence and metastases in the follow-up of patients with breast carcinoma: a comparison to conventional imaging. *Invest Radiol.* 2003;38:250-6.
116. Garambois V, Glaussel F, Foulquier E, Ychou M, Pugnière M, Luo RX, Bezabeh B, Pèlerin A. Fully human IgG and IgM antibodies directed against the carcinoembryonic antigen (CEA) Gold 4 epitope and designed for radioimmunotherapy (RIT) of colorectal cancers. *BMC Cancer.* 2004;4:75.
117. Goldenberg DM, DeLand F, Kim E, Bennett S, Primus FJ, van Nagell JR Jr, Estes N, DeSimone P, Rayburn P. Use of radiolabeled antibodies to carcinoembryonic antigen for the detection and localization of diverse cancers by external photoscanning. *N Engl J Med.* 1978; 298:1384-6.
118. Goldenberg DM, Gaffar SA, Bennett SJ, Beach JL. Experimental radioimmunotherapy of a xenografted human colonic tumor (GW-39) producing carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* 1981; 41:4354-60.
119. Goldenberg DM. Cancer imaging with CEA antibodies: historical and current perspectives. *Int J Biol Markers.* 1992; 7:183-8.
120. Goldenberg DM. New developments in monoclonal antibodies for cancer detection and therapy. *CA Cancer J Clin.* 1994; 44:43-64.
121. Goldenberg DM. Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies. *J Nucl Med.* 2002; 43:693-713.
122. Goldenberg DM, Sharkey RM, Paganelli G, Barbet J, Chatal JF. Antibody pretargeting advances cancer radioimmunodetection and radioimmunotherapy. *J Clin Oncol.* 2006;24:823–834.
123. Goldenberg DM, Rossi EA, Sharkey RM, McBride WJ, Chang CH. Multifunctional antibodies by the Dock-and-Lock method for improved cancer imaging and therapy by pretargeting. *J Nucl Med.* 2008 ; 49:158-163.
124. Goldenberg DM, Sharkey RM. Radioactive antibodies: a historical review of selective targeting and treatment of cancer. *Hosp Pract (Minneap).* 2010; 38:82-93.
125. Gonzalez-Angulo AM, Hennessy BT, Mills GB. Future of personalized medicine in oncology: a systems biology approach. *J Clin Oncol* 2010;28:2777-2783.
126. Goodwin DA. Strategies for antibody targeting. *Antibody Immunoconj. Radiopharm.* 1991; 4: 427-436.
127. Gospodarowicz D, Cheng J. Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. *J Cell Physiol.* 1986;128:475-84.
128. Goss PE, Strasser K. Aromatase inhibitors in the treatment and prevention of breast cancer. *J Clin Oncol.* 2001; 19:881-94.
129. Götte M, Kersting C, Ruggiero M, Tio J, Tulusan AH, Kiesel L, Wülfing P. Predictive value of syndecan-1 expression for the response to neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer. *Anticancer Res.* 2006;26:621-7.

130. Groheux D, Hindié E, Giacchetti S, Delord M, Hamy AS, de Roquancourt A, Vercellino L, Berenger N, Marty M, Espié M. Triple-negative breast cancer: early assessment with 18F-FDG PET/CT during neoadjuvant chemotherapy identifies patients who are unlikely to achieve a pathologic complete response and are at a high risk of early relapse. *J Nucl Med.* 2012;53:249-54.
131. Guadagni F, Schlom J, Greiner JW. In vitro and in vivo regulation of tumor antigen expression by human recombinant interferons. *Int J Rad Appl Instrum B.* 1991; 18:409-12.
132. Hallberg G, Andersson E, Naessén T, Ordeberg GE. The expression of syndecan-1, syndecan-4 and decorin in healthy human breast tissue during the menstrual cycle. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010;8:35.
133. Heskamp S, van Laarhoven HW, Molkenboer-Kuennen JD, Franssen GM, Versleijen-Jonkers YM, Oyen WJ, van der Graaf WT, Boerman OC. ImmunoSPECT and immunoPET of IGF-1R expression with the radiolabeled antibody R1507 in a triple-negative breast cancer model. *J Nucl Med.* 2010;51:1565-1572.
134. Himmelweit F. The collected papers of Paul Ehrlich. Vol3. London: Pergamon; 1960:59.
135. Holen I, Drury NL, Hargreaves PG, Croucher PI. Evidence of a role for a non-matrix-type metalloproteinase activity in the shedding of syndecan-1 from human myeloma cells. *Br J Haematol.* 2001;114:414-21.
136. Holland JP, Caldas-Lopes E, Divilov V, Longo VA, Taldone T, Zatorska D, Chiosis G, Lewis JS. Measuring the pharmacodynamic effects of a novel Hsp90 inhibitor on HER2/neu expression in mice using Zr-DFO-trastuzumab. *PLoS One.* 2010 Jan 25;5(1):e8859.
137. Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol.* 2005;23:1126-36.
138. Howell LP, DeNardo SJ, Levy NB, Lund J, DeNardo GL. Immunohistochemical staining of metastatic ductal carcinomas of the breast by monoclonal antibodies used in imaging and therapy: A comparative study. *Int J Biol Markers.* 1995; 10:129-35.
139. Hugh J, Hanson J, Cheang MC, Nielsen TO, Perou CM, Dumontet C, Reed J, Krajewska M, Treilleux I, Rupin M, Magherini E, Mackey J, Martin M, Vogel C. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol.* 2009; 27:1168-76.
140. Imbert-Marcille BM, Thédrez P, Saï-Maurel C, François C, Auget JL, Benard J, Jacques Y, Imai S, Chatal JF. Modulation of associated ovarian carcinoma antigens by 5 cytokines used as single agents or in combination. *Int J Cancer.* 1994; 57:392-8.
141. Ikeda H, Hideshima T, Fulciniti M, Lutz RJ, Yasui H, Okawa Y, Kiziltepe T, Vallet S, Pozzi S, Santo L, Perrone G, Tai YT, Cirstea D, Raju NS, Uherek C, Dälken B, Aigner S, Osterroth F, Munshi N, Richardson P, Anderson KC. The monoclonal antibody nBT062 conjugated to cytotoxic Maytansinoids has selective cytotoxicity against CD138-positive multiple myeloma cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 2009;15:4028-37.

142. Jain RK, Baxter LT. Mechanisms of heterogeneous distribution of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors: significance of elevated interstitial pressure. *Cancer Res.* 1988; 48:7022-32.
143. Jain RK. Haemodynamic and transport barriers to the treatment of solid tumours. *Int J Radiat Biol.* 1991; 60:85-100.
144. Janeway CSMJ, Travers P, Walport M. In: *Immunobiology*. Newyork: Garland Science Publishing; 2004.
145. Jego G, Bataille R, Pellat-Deceunynck C. IL-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood* 2001, 97 :1817-1822.
146. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010;60:277–300.
147. Joensuu H, Anttonen A, Eriksson M, Mäkitaro R, Alfthan H, Kinnula V, Leppä S. Soluble syndecan-1 and serum basic fibroblast growth factor are new prognostic factors in lung cancer. *Cancer Res.* 2002;62:5210-7.
148. de Jong M, Breeman WA, Valkema R, Bernard BF, Krenning EP. Combination radionuclide therapy using ¹⁷⁷Lu- and ⁹⁰Y-labeled somatostatin analogs. *J Nucl Med.* 2005 Jan;46 Suppl 1:13S-7S.
149. Juuti A, Nordling S, Lundin J, Louhimo J, Haglund C. Syndecan-1 expression--a novel prognostic marker in pancreatic cancer. *Oncology.* 2005;68:97-106.
150. Juweid M, Sharkey RM, Behr T, Swayne LC, Herskovic T, Pereira M, Rubin AD, Hanley D, Dunn R, Siegel J, Goldenberg DM. Radioimmunotherapy of medullary thyroid cancer with iodine-131-labeled anti-CEA antibodies. *J Nucl Med.* 1996; 37:905-11.
151. Kaminski JM, Shinohara E, Summers JB, NiermannKJ, Morimoto A, Brousal J. The controversial abscopal effect. *Cancer Treat Rev* 2005;31:159-172.
152. Kaplan HG, Malmgren JA. Impact of triple negative phenotype on breast cancer prognosis. *Breast J.* 2008;14:456-63.
153. Karacay H, Brard PY, Sharkey RM, Chang CH, Rossi EA, McBride WJ, Ragland DR, Horak ID, Goldenberg DM. Therapeutic advantage of pretargeted radioimmunotherapy using a recombinant bispecific antibody in a human colon cancer xenograft. *Clin Cancer Res.* 2005;11:7879-85.
154. Kasid U, Pfeifer A, Brennan T, Beckett M, Weichselbaum RR, Dritschilo A, Mark GE. Effect of antisense c-raf-1 on tumorigenicity and radiation sensitivity of a human squamous carcinoma. *Science.* 1989; 243:1354-6.
155. Kassis AI, Adelstein SJ. Radiobiologic principles in radionuclide therapy. *J Nucl Med* 2005; 46: 4S-12S.
156. Kassis AI. Therapeutic radionuclides: biophysical and radiobiologic principles. *Semin Nucl Med.* 2008; 38:358-66.
157. Kelly MP, Lee FT, Smyth FE, Brechbiel MW, Scott AM. Enhanced efficacy of ⁹⁰Y-radiolabeled anti-Lewis Y humanized monoclonal antibody hu3S193 and paclitaxel combined-modality radioimmunotherapy in a breast cancer model. *J Nucl Med.* 2006; 47:716-25.
158. Kelly MP, Lee FT, Tahtis K, Smyth FE, Brechbiel MW, Scott AM. Radioimmunotherapy with alpha-particle emitting ²¹³Bi-C-functionalized trans-cyclohexyl-diethylenetriaminepentaacetic acid-humanized 3S193 is enhanced by combination with paclitaxel chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:5604s-5612s.

159. Kelly MP, Lee FT, Tahtis K, Power BE, Smyth FE, Brechbiel MW, Hudson PJ, Scott AM. Tumor targeting by a multivalent single-chain Fv (scFv) anti-Lewis Y antibody construct. *Cancer Biother Radiopharm.* 2008; 23:411-23.
160. Khawli LA, Miller GK, Epstein AL. Effect of seven new vasoactive immunoconjugates on the enhancement of monoclonal antibody uptake in tumors. *Cancer.* 1994; 73:824-31.
161. Khazaeli MB, Saleh MN, Liu TP, Meredith RF, Wheeler RH, Baker TS, King D, Secher D, Allen L, Rogers K, et al. Pharmacokinetics and immune response of ¹³¹I-chimeric mouse/human B72.3 (human gamma 4) monoclonal antibody in humans. *Cancer Res.* 1991; 51:5461-6.
162. Kim H, Kim WJ, Jeon ST, Koh EM, Cha HS, Ahn KS, Lee WH. Cyclophilin A may contribute to the inflammatory processes in rheumatoid arthritis through induction of matrix degrading enzymes and inflammatory cytokines from macrophages. *Clin Immunol.* 2005;116:217-24.
163. Kinnunen A, Kinnunen T, Kaksonen M, Nolo R, Panula P, Rauvala H. N-syndecan and HB-GAM (heparin-binding growth-associated molecule) associate with early axonal tracts in the rat brain. *Eur J Neurosci.* 1998;10:635-48.
164. Knox SJ. Radioimmunotherapy of the Non-Hodgkin's Lymphomas. *Semin Radiat Oncol.* 1995; 5:331-341.
165. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975; 256:495-7.
166. Kosmas C, Snook D, Gooden CS, Courtenay-Luck NS, McCall MJ, Meares CF, Epenetos AA. Development of humoral immune responses against a macrocyclic chelating agent (DOTA) in cancer patients receiving radioimmunoconjugates for imaging and therapy. *Cancer Res.* 1992; 52:904-11.
167. Koziol JA, Lee PP, Dillman RO, Fagnani R, Halpern SE. Pharmacokinetics of ¹¹¹In-labelled monoclonal antibody ZCE-025 and fragments in tumour-bearing mice. *Nucl Med Commun.* 1995; 16:299-305.
168. Kraeber-Bodéré F, Faivre-Chauvet A, Saï-Maurel C, Gautherot E, Fiche M, Champion L, Le Boterff J, Barbet J, Chatal JF, Thédrez P. Bispecific antibody and bivalent hapten radioimmunotherapy in CEA-producing medullary thyroid cancer xenograft. *J Nucl Med.* 1999;40:198-204.
169. Kraeber-Bodere F, Rousseau C, Bodet-Milin C, Ferrer L, Faivre-Chauvet A, Champion L, Vuillez JP, Devillers A, Chang CH, Goldenberg DM, Chatal JF, Barbet J. Targeting, toxicity and efficacy of 2-step, pretargeted radioimmunotherapy using a chimeric bispecific antibody and ¹³¹I-labeled bivalent hapten in a phase I optimisation clinical trial. *J Nucl Med.* 2006; 47:247-255.
170. Kraeber-Bodéré F. Radioimmunothérapie du cancer médullaire de la thyroïde. Th Doctorat, Discipline Biologie Médecine Santé, Nantes ; 2003, pp 1-169.
171. Kuroki M, Fernsten PD, Wunderlich D, Colcher D, Simpson JF, Poole DJ, Schlom J. Serological mapping of the TAG-72 tumor-associated antigen using 19 distinct monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 1990; 50:4872-9.
172. Langmuir VK, Mendonca HL. The combined use of ¹³¹I-labeled antibody and the hypoxic cytotoxin SR 4233 in vitro and in vivo. *Radiat Res.* 1992; 132:351-8.

173. Larsen RH, Murud KM, Hoff P, Bruland ØS, Zalutsky MR. 211At- and 131I-labeled bisphosphonates with high in vivo stability and bone accumulation. *J Nucl Med* 1999;40:1197–1203.
174. Lear-Kaul KC, Yoon HR, Kleinschmidt-DeMasters BK, McGavran L, Singh M. Her-2/neu status in breast cancer metastases to the central nervous system. *Arch Pathol Lab Med*. 2003 Nov;127(11):1451-7.
175. Leivonen M, Lundin J, Nordling S, von Boguslawski K, Haglund C. Prognostic value of syndecan-1 expression in breast cancer. *Oncology*. 2004;67:11-8.
176. Leonard JP, Coleman M, Kostakoglu L, Chadburn A, Cesarman E, Furman RR, Schuster MW, Niesvizky R, Muss D, Fiore J, Kroll S, Tidmarsh G, Vallabhajosula S, Goldsmith SJ. Abbreviated chemotherapy with fludarabine followed by tositumomab and iodine I 131 tositumomab for untreated follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005; 23:5696-704.
177. Le Pendu J, Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Clément M. ABH and Lewis histo-blood group antigens in cancer. *APMIS*. 2001; 109:9-31.
178. Levy P, Munier A, Baron-Delage S, Di Gioia Y, Gespach C, Capeau J, Cherqui G. Syndecan-1 alterations during the tumorigenic progression of human colonic Caco-2 cells induced by human Ha-ras or polyoma middle T oncogenes. *Br J Cancer*. 1996;74:423-31.
179. Lichter AS, Lippman ME, Danforth DN Jr, d'Angelo T, Steinberg SM, deMoss E, MacDonald HD, Reichert CM, Merino M, Swain SM, et al. Mastectomy versus breast-conserving therapy in the treatment of stage I and II carcinoma of the breast: a randomized trial at the National Cancer Institute. *J Clin Oncol*. 1992; 10:976-83.
180. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, Symmans WF, Gonzalez-Angulo AM, Hennessy B, Green M, Cristofanilli M, Hortobagyi GN, Pusztai L. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008; 26:1275-81.
181. Liersch T, Meller J, Kulle B, Behr TM, Markus P, Langer C, Ghadimi BM, Wegener WA, Kovacs J, Horak ID, Becker H, Goldenberg DM. Phase II trial of carcinoembryonic antigen radioimmunotherapy with 131I-labetuzumab after salvage resection of colorectal metastases in the liver: five-year safety and efficacy results. *J Clin Oncol*. 2005; 23:6763-70.
182. Liersch T, Meller J, Bittrich M, Kulle B, Becker H, Goldenberg DM. Update of carcinoembryonic antigen radioimmunotherapy with (131)I-labetuzumab after salvage resection of colorectal liver metastases: comparison of outcome to a contemporaneous control group. *Ann Surg Oncol*. 2007;14:2577-90.
183. Lim E, Vaillant F, Wu D, Forrest NC, Pal B, Hart AH, Asselin-Labat ML, Gyorki DE, Ward T, Partanen A, Feleppa F, Huschtscha LI, Thorne HJ; kConFab, Fox SB, Yan M, French JD, Brown MA, Smyth GK, Visvader JE, Lindeman GJ. Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med*. 2009; 15:907-13.
184. Lin FI, Iagaru A. Current concepts and future directions in radioimmunotherapy. *Curr Drug Discov Technol*. 2010; 7:253-62.
185. Linden HM, Stekhova SA, Link JM, Gralow JR, Livingston RB, Ellis GK, Petra PH, Peterson LM, Schubert EK, Dunnwald LK, Krohn KA, Mankoff DA.

- Quantitative fluoroestradiol positron emission tomography imaging predicts response to endocrine treatment in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006 ;24:2793-9.
186. Lindmo T, Boven E, Cuttitta 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.
187. Liu H, Moy P, Kim S, et al. Monoclonal antibodies to the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen also react with tumor vascular endothelium. *Cancer Res.* 1997; 57:3629–3634.
188. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, Perou CM. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol.* 2006; 19:264-71.
189. Löfgren L, Sahlin L, Jiang S, Von Schoultz B, Fernstad R, Skoog L, Von Schoultz E. Expression of syndecan-1 in paired samples of normal and malignant breast tissue from postmenopausal women. *Anticancer Res.* 2007;27:3045-50.
190. Loussouarn D, Champion L, Sagan C, Frenel JS, Dravet F, Classe JM, Pioud-Martigny R, Berton-Rigaud D, Bourbouloux E, Mosnier JF, Bataille FR, Campone M. Prognostic impact of syndecan-1 expression in invasive ductal breast carcinomas. *Br J Cancer.* 2008;98:1993-8.
191. Lovell R, Dunn JA, Begum G, Barth NJ, Plant T, Moss PA, Drayson MT, Pratt G; Working Party on Leukaemia in Adults of the National Cancer Research Institute Haematological Oncology Clinical Studies Group. Soluble syndecan-1 level at diagnosis is an independent prognostic factor in multiple myeloma and the extent of fall from diagnosis to plateau predicts for overall survival. *Br J Haematol.* 2005;130:542-8.
192. Lundin M, Nordling S, Lundin J, Isola J, Wiksten JP, Haglund C. Epithelial syndecan-1 expression is associated with stage and grade in colorectal cancer. *Oncology.* 2005;68:306-13.
193. Lundström E, Sahlin L, Skoog L, Hägerström T, Svane G, Azavedo E, Sandelin K, von Schoultz B. Expression of Syndecan-1 in histologically normal breast tissue from postmenopausal women with breast cancer according to mammographic density. *Climacteric.* 2006;9:277-82.
194. Maeda T, Alexander CM, Friedl A. Induction of syndecan-1 expression in stromal fibroblasts promotes proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2004;64:612-21.
195. Maeda T, Desouky J, Friedl A. Syndecan-1 expression by stromal fibroblasts promotes breast carcinoma growth in vivo and stimulates tumor angiogenesis. *Oncogene.* 2006;25:1408-12.
196. Mahtouk K, Hose D, Raynaud P, Hundemer M, Jourdan M, Jourdan E, Pantesco V, Baudard M, De Vos J, Larroque M, Moehler T, Rossi JF, Rème T, Goldschmidt H, Klein B. Heparanase influences expression and shedding of syndecan-1, and its expression by the bone marrow environment is a bad prognostic factor in multiple myeloma. *Blood.* 2007;109:4914-23.
197. Manon-Jensen T, Itoh Y, Couchman JR. Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *FEBS J.* 2010;277:3876-89.
198. Marik J, Junutula JR. Emerging role of immunoPET in receptor targeted cancer therapy. *Curr Drug Deliv.* 2011;8:70-8.

199. Marken JS, Schieven GL, Hellström I, Hellström KE, Aruffo A. Cloning and expression of the tumor-associated antigen L6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89:3503-7.
200. Marshall LJ, Ramdin LS, Brooks T, DPhil PC, Shute JK. Plasminogen activator inhibitor-1 supports IL-8-mediated neutrophil transendothelial migration by inhibition of the constitutive shedding of endothelial IL-8/heparan sulfate/syndecan-1 complexes. *J Immunol*. 2003;171:2057-65.
201. Mårtensson L, Nilsson R, Ohlsson T, Sjögren HO, Strand SE, Tennvall J. Reduced myelotoxicity with sustained tumor concentration of radioimmunoconjugates in rats after extracorporeal depletion. *J Nucl Med*. 2007; 48:269-76.
202. Massuger LF, Boerman OC, Corstens FH, Verheijen RH, Claessens RA, Poels LG, van den Broek WJ, Kenemans P. Biodistribution of iodine-125 and indium-111 labeled OV-TL 3 intact antibodies and F(ab')₂ fragments in tumor-bearing athymic mice. *Anticancer Res*. 1991; 11:2051-7.
203. Matsuda K, Maruyama H, Guo F, Kleeff J, Itakura J, Matsumoto Y, Lander AD, Korc M. Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2001;61:5562-9.
204. Mattes MJ. Radionuclide-antibody conjugates for single-cell cytotoxicity. *Cancer*. 2002; 94:1215-23.
205. Mausner LF, Srivastava SC. Selection of radionuclides for radioimmunotherapy. *Med Phys*. 1993; 20:503-9.
206. McBride WJ, Zanzonico P, Sharkey RM, Norén C, Karacay H, Rossi EA, Losman MJ, Brard PY, Chang CH, Larson SM, Goldenberg DM. Bispecific antibody pretargeting PET (immunoPET) with an ¹²⁴I-labeled hapten-peptide. *J Nucl Med*. 2006;47:1678-88.
207. McCabe KE, Wu AM. Positive progress in immunoPET--not just a coincidence. *Cancer Biother Radiopharm*. 2010;25:253-61.
208. McDevitt MR, Sgouros G, Finn RD, Humm JL, Jurcic JG, Larson SM, et al. Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur J Nucl Med*. 1998;25:1341-1351.
209. McLaughlin P, Grillo-López AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR, Bence-Bruckler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister J, Wey K, Shen D, Dallaire BK. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*. 1998; 16:2825-33.
210. McLendon RE, Akabani G, Friedman HS, Reardon DA, Cleveland L, Cokgor I, Herndon JE 2nd, Wikstrand C, Boulton ST, Friedman AH, Bigner DD, Zalutsky MR. Tumor resection cavity administered iodine-131-labeled antitenascin 81C6 radioimmunotherapy in patients with malignant glioma: neuropathology aspects. *Nucl Med Biol*. 2007; 34:405-13.
211. Melchior A., Etude de l'activité de la cyclosporine B sur les macrophages, Th Doctorat, Discipline Sciences de la vie et de la santé, Lille;2007, pp 1-236.
212. Mennerich D, Vogel A, Klamann I, Dahl E, Lichtner RB, Rosenthal A, Pohlentz HD, Thierach KH, Sommer A. Shift of syndecan-1 expression from epithelial to

- stromal cells during progression of solid tumours. *Eur J Cancer*. 2004;40:1373-82.
213. Meredith RF, LoBuglio AF, Plott WE, Orr RA, Brezovich IA, Russell CD, Harvey EB, Yester MV, Wagner AJ, Spencer SA, et al. Pharmacokinetics, immune response, and biodistribution of iodine-131-labeled chimeric mouse/human IgG1,k 17-1A monoclonal antibody. *J Nucl Med*. 1991; 32:1162-8.
 214. Meredith RF, Khazaeli MB, Plott WE, Saleh MN, Liu T, Allen LF, Russell CD, Orr RA, Colcher D, Schlom J, et al. Phase I trial of iodine-131-chimeric B72.3 (human IgG4) in metastatic colorectal cancer. *J Nucl Med*. 1992; 33:23-9.
 215. Meredith RF, Alvarez RD, Partridge EE, Khazaeli MB, Lin CY, Macey DJ, Austin JM Jr, Kilgore LC, Grizzle WE, Schlom J, LoBuglio AF. Intraperitoneal radioimmunotherapy of ovarian cancer: a phase I study. *Cancer Biother Radiopharm*. 2001; 16:305-15.
 216. Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, Shenkier T, Cella D, Davidson NE. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2007; 357:2666-76.
 217. Millikan RC, Newman B, Tse CK, Moorman PG, Conway K, Dressler LG, Smith LV, Labbok MH, Geradts J, Bensen JT, Jackson S, Nyante S, Livasy C, Carey L, Earp HS, Perou CM. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008; 109:123-39.
 218. Milowsky MI, Nanus DM, Kostakoglu L, Vallabhajosula S, Goldsmith SJ, Bander NH. Phase I trial of yttrium-90-labeled anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 for androgen-independent prostate cancer. see comment. *J Clin Oncol*. 2004; 22:2522–2531.
 219. Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6:583-92.
 220. Mirallié E, Vuillez JP, Bardet S, Frampas E, Dupas B, Ferrer L, Faivre-Chauvet A, Murat A, Charbonnel B, Barbet J, Goldenberg DM, Chatal JF, Kraeber-Bodéré F. High frequency of bone/bone marrow involvement in advanced medullary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:779-88.
 221. Mitsiades CS, Davies FE, Laubach JP, Joshua D, San Miguel J, Anderson KC, Richardson PG. Future directions of next-generation novel therapies, combination approaches, and the development of personalized medicine in myeloma. *J Clin Oncol* 2011;29:1916-1923.
 222. Mohammadnejad J, Rasaei MJ, Babaei MH, Paknejad M, Zahir MH, Salouti M, Rajabi AB, Mazidi M. A new radiopharmaceutical compound (¹³¹I-PR81) for radioimmunotherapy of breast cancer: labeling of antibody and its quality control. *Hum Antibodies*. 2010; 19:79-88.
 223. Molinolo A, Simpson JF, Thor A, Schlom J. Enhanced tumor binding using immunohistochemical analyses by second generation anti-tumor-associated glycoprotein 72 monoclonal antibodies versus monoclonal antibody B72.3 in human tissue. *Cancer Res*. 1990; 50:1291-8.
 224. Morschhauser F, Radford J, Van Hoof A, Vitolo U, Soubeyran P, Tilly H, Huijgens PC, Kolstad A, d'Amore F, Gonzalez Diaz M, Petrini M, Sebban C, Zinzani PL, van Oers MH, van Putten W, Bischof-Delaloye A, Rohatiner A, Salles G, Kuhlmann J, Hagenbeek A. Phase III trial of consolidation therapy with yttrium-

- 90-ibrutumomab tiuxetan compared with no additional therapy after first remission in advanced follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2008; 26:5156-64.
225. Moseley KR, Battaile A, Knapp RC, Haisma HJ. Localization of radiolabelled F(ab')₂ fragments of monoclonal antibodies in nude mice bearing intraperitoneally growing human ovarian cancer xenografts. *Int J Cancer.* 1988; 42:368-72.
226. Mothersill C, Seymour CB. Radiation-induced bystander effects and the DNA paradigm: an « out of field » perspective. *Mut Res* 2006; 597:5-10.
227. Mukunyadzi P, Liu K, Hanna EY, Suen JY, Fan CY. Induced expression of syndecan-1 in the stroma of head and neck squamous cell carcinoma. *Mod Pathol.* 2003;16:796-801.
228. Mulford DA, Scheinberg DA, Jurcic JG. The promise of targeted {alpha}-particle therapy. *J Nucl Med.* 2005; 46 Suppl 1:199S-204S.
229. Mullan PB, Quinn JE, Harkin DP. The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control. *Oncogene.* 2006; 25:5854-63.
230. Murray JL, Cunningham JE, Brewer H, Mujoo K, Zukiwski AA, Podoloff DA, Kasi LP, Bhadkamkar V, Fritsche HA, Benjamin RS, et al. Phase I trial of murine monoclonal antibody 14G2a administered by prolonged intravenous infusion in patients with neuroectodermal tumors. *J Clin Oncol.* 1994; 12:184-93.
231. Murray JL, Macey DJ, Grant EJ, Rosenblum MG, Kasi LP, Zhang HZ, Katz RL, Riger PT, LeBherz D, Bhadkamkar V, et al. Enhanced TAG-72 expression and tumor uptake of radiolabeled monoclonal antibody CC49 in metastatic breast cancer patients following alpha-interferon treatment. *Cancer Res.* 1995; 55:5925s-5928s.
232. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, Akslen LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, van de Rijn M, Perou CM. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004; 10:5367-74.
233. Nikolova V, Koo CY, Ibrahim SA, Wang Z, Spillmann D, Dreier R, Kelsch R, Fischgräbe J, Smollich M, Rossi LH, Sibrowski W, Wülfing P, Kiesel L, Yip GW, Götte M. Differential roles for membrane-bound and soluble syndecan-1 (CD138) in breast cancer progression. *Carcinogenesis.* 2009;30:397-407.
234. Olafsen T, Wu AM. Antibody vectors for imaging. *Semin Nucl Med* 2010; 40:167-81.
235. Oude Munnink TH, Nagengast WB, Brouwers AH, Schröder CP, Hospers GA, Lub-de Hooge MN, van der Wall E, van Diest PJ, de Vries EG. Molecular imaging of breast cancer. *Breast.* 2009;18 :S66-73.
236. Pagel JM, Boerman OC, Breitz HB, et al. Targeted radionuclide therapy of cancer. In: Oldham RK, Dillman RO, eds. *Principles of Cancer Biotherapy*, 5th ed. New York: Springer, 2009; 463.
237. Pantaleo MA, Nannini M, Maleddu A, Fanti S, Nanni C, Boschi S, Lodi F, Nicoletti G, Landuzzi L, Lollini PL, Biasco G. Experimental results and related clinical implications of PET detection of epidermal growth factor receptor (EGFr) in cancer. *Ann Oncol.* 2009;20:213-26.
238. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu

- SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406:747-52.
239. Peterson JA, Blank EW, Ceriani RL. Effect of multiple, repeated doses of radioimmunotherapy on target antigen expression (breast MUC-1 mucin) in breast carcinomas. *Cancer Res*. 1997; 57:1103-8.
240. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Láng I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Rüschoff J, Suto T, Greaux V, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD; Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005; 353:1659-72.
241. Perk LR, Visser GW, Vosjan MJ, Stigter-van Walsum M, Tjink BM, Leemans CR, van Dongen GA. ⁸⁹Zr as a PET surrogate radioisotope for scouting biodistribution of the therapeutic radiometals ⁹⁰Y and ¹⁷⁷Lu in tumor-bearing nude mice after coupling to the internalizing antibody cetuximab. *J Nucl Med*. 2005;46:1898-906.
242. Perk LR, Visser OJ, Stigter-van Walsum M, Vosjan MJ, Visser GW, Zijlstra JM, Huijgens PC, van Dongen GA. Preparation and evaluation of ⁸⁹Zr-Zevalin for monitoring of ⁹⁰Y-Zevalin biodistribution with positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2006 ;33:1337-45.
243. Pimm MV. Circulating antigen: bad or good for immunoscintigraphy? *Nucl Med Biol*. 1995; 22:137-45.
244. Press OW, Farr AG, Borroz KI, Anderson SK, Martin PJ. Endocytosis and degradation of monoclonal antibodies targeting human B-cell malignancies. *Cancer Res*. 1989; 49:4906-12.
245. Press OW, Unger JM, Brazier RM, Maloney DG, Miller TP, LeBlanc M, Gaynor ER, Rivkin SE, Fisher RI. A phase 2 trial of CHOP chemotherapy followed by tositumomab/iodine I 131 tositumomab for previously untreated follicular non-Hodgkin lymphoma: Southwest Oncology Group Protocol S9911. *Blood*. 2003; 102:1606-12.
246. Pressman D, Korngold I. The in vivo localization of anti-Wagner-osteogenic-sarcoma antibodies. *Cancer*. 1953; 6:619-23.
247. Prise KM, Schettino G, Folkard M, Held KD. New insights on cell death from radiation exposure. *Lancet Oncol* 2007;6:520–8.
248. Pryma DA, O'Donoghue JA, Humm JL, Jungbluth AA, Old LJ, Larson SM, Divgi CR. Correlation of in vivo and in vitro measures of carbonic anhydrase IX antigen expression in renal masses using antibody ¹²⁴I-cG250. *J Nucl Med*. 2011 ;52:535-40.
249. Pouget JP, Mather SJ. General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation. *Eur J Nucl Med*. 2001; 28:541-61.
250. Rakha EA, El-Rehim DA, Paish C, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Blamey RW, Macmillan D, Ellis IO. Basal phenotype identifies a poor prognostic subgroup of breast cancer of clinical importance. *Eur J Cancer*. 2006; 42:3149-56.
251. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*. 2007; 109:25-32. A.

252. Rakha EA, Tan DS, Foulkes WD, Ellis IO, Tutt A, Nielsen TO, Reis-Filho JS. Are triple-negative tumours and basal-like breast cancer synonymous? *Breast Cancer Res.* 2007;9:404.B
253. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol.* 2008; 26:2568-81.
254. Rasaneh S, Rajabi H, Babaei MH, Daha FJ, Salouti M. Radiolabeling of trastuzumab with ¹⁷⁷Lu via DOTA, a new radiopharmaceutical for radioimmunotherapy of breast cancer. *Nucl Med Biol.* 2009; 36:363-9.
255. Rasaneh S, Rajabi H, Hossein Babaei M, Johari Daha F. Toxicity of trastuzumab labeled ¹⁷⁷Lu on MCF7 and SKBr3 cell lines. *Appl Radiat Isot.* 2010; 68:1964-6.
256. Ravaud A. The mechanism of tumor angiogenesis. *Prog Urol.* 2007; 17:144-7.
257. Ravdin PM, Chamness GC. The c-erbB-2 proto-oncogene as a prognostic and predictive marker in breast cancer: a paradigm for the development of other macromolecular markers--a review. *Gene.* 1995; 159:19-27.
258. Reardon DA, Zalutsky MR, Akabani G, Coleman RE, Friedman AH, Herndon JE 2nd, McLendon RE, Pegram CN, Quinn JA, Rich JN, Vredenburg JJ, Desjardins A, Guruangan S, Boulton S, Raynor RH, Dowell JM, Wong TZ, Zhao XG, Friedman HS, Bigner DD. A pilot study: ¹³¹I-antitnascin monoclonal antibody 81c6 to deliver a 44-Gy resection cavity boost. *Neuro Oncol.* 2008;10:182-9.
259. Reddy KB Triple-negative breast cancers: an updated review on treatment options. *Curr Oncol.* 2011;18:173-9.
260. Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology.* 2008; 52:108-18.
261. Richman CM, Schuermann TC, Wun T, Malik R, O'Donnell RT, DeNardo GL, DeNardo SJ. Peripheral blood stem cell mobilization for hematopoietic support of radioimmunotherapy in patients with breast carcinoma. *Cancer.* 1997; 80:2728-32.
262. Richman CM, DeNardo SJ, O'Donnell RT, Goldstein DS, Shen S, Kukis DL, Kroger LA, Yuan A, Boniface GR, Griffith IJ, DeNardo GL. Dosimetry-based therapy in metastatic breast cancer patients using ⁹⁰Y monoclonal antibody 170H.82 with autologous stem cell support and cyclosporin A. *Clin Cancer Res.* 1999; 5:3243s-3248s.
263. Richman CM, Denardo SJ, O'Donnell RT, Yuan A, Shen S, Goldstein DS, Tuscano JM, Wun T, Chew HK, Lara PN, Kukis DL, Natarajan A, Meares CF, Lamborn KR, DeNardo GL. High-dose radioimmunotherapy combined with fixed, low-dose paclitaxel in metastatic prostate and breast cancer by using a MUC-1 monoclonal antibody, m170, linked to indium-111/yttrium-90 via a cathepsin cleavable linker with cyclosporine to prevent human anti-mouse antibody. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:5920-7.
264. 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.* 1993;81:767-74.
265. Riva P, Franceschi G, Riva N, Casi M, Santimaria M, Adamo M. Role of nuclear medicine in the treatment of malignant gliomas: the locoregional radioimmunotherapy approach. *Eur J Nucl Med.* 2000; 27:601-9.

266. Robinson MK, Doss M, Shaller C, Narayanan D, Marks JD, Adler LP, González Trotter DE, Adams GP. Quantitative immuno-positron emission tomography imaging of HER2-positive tumor xenografts with an iodine-124 labeled anti-HER2 diabody. *Cancer Res.* 2005;65:1471-8
267. Rodríguez-Pinilla SM, Sarrió D, Honrado E, Hardisson D, Calero F, Benitez J, Palacios J. Prognostic significance of basal-like phenotype and fascin expression in node-negative invasive breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2006;12:1533-9.
268. Roodman GD. Role of the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *J Bone Miner Res.* 2002;17:1921-5.
269. Rossi EA, et al. Stably tethered multifunctional structures of defined composition made by the dock and lock method for use in cancer targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103:6841-6.
270. Rousseau C, Ruellan AL, Bernardeau K, Kraeber-Bodéré F, Gouard S, Loussouarn D, Sai-Maurel C, Faivre-Chauvet A, Wijdenes J, Barbet J, Gaschet J, Chérel M, Davodeau F. Syndecan-1 antigen, a promising new target for triple-negative breast cancer immuno-PET and radioimmunotherapy. A preclinical study on MDA-MB-468 xenograft tumors. *EJNMMI Res.* 2011;1:20.
271. Rousseau C, Ferrer L, Supiot S, Bardiès M, Davodeau F, Faivre-Chauvet A, Baumgartner P, Wijdenes J, Lacombe M, Barbet J, Guillaume T, Moreau P, Harousseau JL, Kraeber-Bodéré F, Chérel M. Dosimetry results suggest feasibility of radioimmunotherapy using anti-CD138 (B-B4) antibody in multiple myeloma patients. *Tumour Biol.* 2012;33:679-88.
272. Rudnick SI, Adams GP. Affinity and avidity in antibody-based tumor targeting. *Cancer Biother Radiopharm.* 2009; 24:155-61.
273. Ruellan A-L. Ciblage du syndecan-1 dans un modèle de xénogreffe de carcinoma mammaire en radioimmunothérapie alpha et béta. Th Doctorat, Discipline Biologie Médecine Santé, Nantes ; 2009, pp 1-191.
274. Ruitkamp J, Ernst MF, de Munck L, van der Heiden-van der Loo M, Bastiaannet E, van de Poll-Franse LV, Bosscha K, Tjan-Heijnen VC, Voogd AC. Improved survival of patients with primary distant metastatic breast cancer in the period of 1995-2008. A nationwide population-based study in the Netherlands. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;128:495-503.
275. Salaün PY. Radioimmunociblage du cancer médullaire de la thyroïde : aspects diagnostique, pronostique et thérapeutique. Th Doctorat, Discipline Biologie Médecine Santé, Brest ; 2008, pp 1-167.
276. Salaün PY, Campion L, Bournaud C, Faivre-Chauvet A, Vuillez JP, Taieb D, Ansquer C, Rousseau C, Borson-Chazot F, Bardet S, Oudoux A, Cariou B, Mirallié E, Chang CH, Sharkey RM, Goldenberg DM, Chatal JF, Barbet J, Kraeber-Bodéré F. Phase II Trial of Anticarcinoembryonic Antigen Pretargeted Radioimmunotherapy in Progressive Metastatic Medullary Thyroid Carcinoma: Biomarker Response and Survival Improvement. *J Nucl Med.* 2012;53(8):1185-92.
277. Sanderson RD, Lalor P, Bernfield M. B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul.* 1989;1:27-35.
278. Sanderson RD, Børset M. Syndecan-1 in B lymphoid malignancies. *Ann Hematol.* 2002;81:125-35.

279. Sanderson RD, Yang Y. Syndecan-1: a dynamic regulator of the myeloma microenvironment. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(2):149-59.
280. Schaefer L, Schaefer RM. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res*. 2010;339:237-46.
281. Sasisekharan R, Shriver Z, Venkataraman G, Narayanasami U. Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:521-8.
282. Schlom J, Siler K, Milenic DE, Eggensperger D, Colcher D, Miller LS, Houchens D, Cheng R, Kaplan D, Goeckeler W. Monoclonal antibody-based therapy of a human tumor xenograft with a 177lutetium-labeled immunoconjugate. *Cancer Res*. 1991; 51:2889-96.
283. Schlumberger M, Challeton C, De Vathaire F, Travagli JP, Gardet P, Lumbroso JD, Francese C, Fontaine F, Ricard M, Parmentier C. Radioactive iodine treatment and external radiotherapy for lung and bone metastases from thyroid carcinoma. *J Nucl Med*. 1996; 37:598-605.
284. Schoffelen R, Sharkey RM, Goldenberg DM, Franssen G, McBride WJ, Rossi EA, Chang CH, Laverman P, Disselhorst JA, Eek A, van der Graaf WT, Oyen WJ, Boerman OC. Pretargeted immuno-positron emission tomography imaging of carcinoembryonic antigen-expressing tumors with a bispecific antibody and a 68Ga- and 18F-labeled hapten peptide in mice with human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther*. 2010;9:1019-27.
285. Schott ME, Milenic DE, Yokota T, Whitlow M, Wood JF, Fordyce WA, Cheng RC, Schlom J. Differential metabolic patterns of iodinated versus radiometal chelated anticarcinoma single-chain Fv molecules. *Cancer Res*. 1992; 52:6413-7.
286. Schrier DM, Stemmer SM, Johnson T, Kasliwal R, Lear J, Matthes S, Taffs S, Dufton C, Glenn SD, Butchko G, et al. High-dose 90Y Mx-diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA)-BrE-3 and autologous hematopoietic stem cell support (AHSCS) for the treatment of advanced breast cancer: a phase I trial. *Cancer Res*. 1995; 55:5921s-5924s.
287. Schuhmacher J, Kaul S, Klivényi G, Junkermann H, Magener A, Henze M, Doll J, Haberkorn U, Amelung F, Bastert G. Immunoscintigraphy with positron emission tomography: gallium-68 chelate imaging of breast cancer pretargeted with bispecific anti-MUC1/anti-Ga chelate antibodies. *Cancer Res* 2001;61:3712-17.
288. Seidel C, Sundan A, Hjorth M, Turesson I, Dahl IM, Abildgaard N, Waage A, Børset M. Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma. *Blood*. 2000;95:388-392.
289. Seidel C, Børset M, Hjertner O, Cao D, Abildgaard N, Hjorth-Hansen H, Sanderson RD, Waage A, Sundan A. High levels of soluble syndecan-1 in myeloma-derived bone marrow: modulation of hepatocyte growth factor activity. *Blood*. 2000;96:3139-46.
290. Seregni E, Coli A, Mazzucca N; Italian Group RIA-IRMA Test, Italian Association of Nuclear Medicine. Circulating tumour markers in breast cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004; 31 Suppl 1:S15-22.
291. Sharkey RM, Goldenberg DM. Use of antibodies and immunoconjugates for the therapy of more accessible cancers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008; 60:1407-20.
292. Sharkey RM, Karacay H, Vallabhajosula S, McBride WJ, Rossi EA, Chang CH, Goldsmith SJ, Goldenberg DM. Metastatic human colonic carcinoma: molecular

- imaging with pretargeted SPECT and PET in a mouse model. *Radiology*. 2008;246:497-507.
293. Sharkey RM, Goldenberg DM. Cancer radioimmunotherapy. *Immunotherapy*. 2011; 3:349-70.
294. Shinyo Y, Kodama J, Hasengaowa, Kusumoto T, Hiramatsu Y. Loss of cell-surface heparan sulfate expression in both cervical intraepithelial neoplasm and invasive cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2005;96:776-83.
295. Shipley WU, Stanley JA, Steel GG. Tumor size dependency in the radiation response of the Lewis lung carcinoma. *Cancer Res*. 1975; 35:2488-93.
296. Sirohi B, Arnedos M, Popat S, Ashley S, Nerurkar A, Walsh G, Johnston S, Smith IE. Platinum-based chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*. 2008; 19:1847-52.
297. Slavin-Chiorini DC, Horan Hand P, Greiner JW. Antibodies and novel constructs for tumor targeting. In: Abrams PG, Fritzberg AR, eds. *Radioimmunotherapy of Cancer*. New York: Marcel Dekker, 2000; 137.
298. Song H, Shahverdi K, Huso DL, Esaias C, Fox J, Liedy A, Zhang Z, Reilly RT, Apostolidis C, Morgenstern A, Sgouros G. ²¹³Bi (alpha-emitter)-antibody targeting of breast cancer metastases in the neu-N transgenic mouse model. *Cancer Res*. 2008; 68:3873-80.
299. Song H, Hobbs RF, Vajravelu R, Huso DL, Esaias C, Apostolidis C, Morgenstern A, Sgouros G. Radioimmunotherapy of breast cancer metastases with alpha-particle emitter ²²⁵Ac: comparing efficacy with ²¹³Bi and ⁹⁰Y. *Cancer Res*. 2009; 69:8941-8.
300. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lønning P, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:10869-74.
301. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:8418-23.
302. Staudacher L. Les sels de Platine dans les cancers mammaires "triple negatives" en situation métastatique. *Th D Méd, Discipline Oncologie Médicale, Paris V*;2009, pp 1-84.
303. Stein R, Blumenthal R, Sharkey RM, Goldenberg DM. Comparative biodistribution and radioimmunotherapy of monoclonal antibody RS7 and its F(ab')₂ in nude mice bearing human tumor xenografts. *Cancer*. 1994; 73:816-23.
304. Stewart LM, Young S, Watson G, Mather SJ, Bates PA, Band HA, Wilkinson RW, Ross EL, Snary D. Humanisation and characterization of PR1A3, a monoclonal antibody specific for cellbound carcinoembryonic antigen. *Cancer Immunol Immunother* 1999, 47:299-306.
305. Stigbrand T, Ullén A, Sandstrom P, Mirzaie-Joniani H, Sundström B, Nillson B, Arlestig L, Norrlund RR, Ahlström KR, Hietala S. Twenty years with monoclonal antibodies: State of the art--Where do we go? *Acta Oncol*. 1996; 35:259-65.

306. Supiot S, Faivre-Chauvet A, Couturier O, Heymann MF, Robillard N, Kraeber-Bodere F, 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(4 Suppl):1202-1209.
307. Sutherland R, Buchegger F, Schreyer M, Vacca A, Mach JP. Penetration and binding of radiolabeled anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibodies and their antigen binding fragments in human colon multicellular tumor spheroids. *Cancer Res*. 1987; 47:1627-33.
308. Sweat SD, Pacelli A, Murphy GP, Bostwick DG. Prostate-specific membrane antigen expression is greatest in prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. *Urology*. 1998; 52:637-640.
309. Tagawa ST, Milowsky MI, Morris M, et al. Phase II trial of ¹⁷⁷Lutetium radiolabeled antiprostata-specific membrane antigen (PSMA) monoclonal antibody J591 (¹⁷⁷Lu-J591) in patients (pts) with metastatic castrate-resistant prostate cancer (metCRPC). *J Clin Oncol*. 2008; 26:284s.Abst 5140.
310. Tagawa ST, Beltran H, Vallabhajosula S, Goldsmith SJ, Osborne J, Matulich D, Petrillo K, Parmar S, Nanus DM, Bander NH. Anti-prostate-specific membrane antigen-based radioimmunotherapy for prostate cancer. *Cancer*. 2010; 116:1075-83.
311. Tassone P, Goldmacher VS, Neri P, Gozzini A, Shamma MA, Whiteman KR, Hylander-Gans LL, Carrasco DR, Hideshima T, Shringarpure R, Shi J, Allam CK, Wijdenes J, Venuta S, Munshi NC, Anderson KC. Cytotoxic activity of the maytansinoid immunoconjugate B-B4-DM1 against CD138+ multiple myeloma cells. *Blood*. 2004;104:3688-96.
312. Tchou J, Sonnad SS, Bergey MR, Basu S, Tomaszewski J, Alavi A, Schnall M. Degree of tumor FDG uptake correlates with proliferation index in triple negative breast cancer. *Mol Imaging Biol*. 2010;12:657-62.
313. Theocharis AD, Skandalis SS, Tzanakakis GN, Karamanos NK. Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *FEBS J*. 2010 ;277:3904-23.
314. Tilyou SM. Radioimmunoconjugates. Targeting disease for diagnosis and treatment. *J Nucl Med*. 1990; 31:15A-20A, 30A.
315. Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res*. 2005 Mar 18;96:488-500.
316. Turner NC, Reis-Filho JS. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene*. 2006; 25:5846-53.
317. Ueno M, Yamada S, Zako M, Bernfield M, Sugahara K. Structural characterization of heparan sulfate and chondroitin sulfate of syndecan-1 purified from normal murine mammary gland epithelial cells. Common phosphorylation of xylose and differential sulfation of galactose in the protein linkage region tetrasaccharide sequence. *J Biol Chem*. 2001;276:29134-40.
318. Vallabhajosula S, Goldsmith SJ, Hamacher KA, Kostakoglu L, Konishi S, Milowski MI, Nanus DM, Bander NH. Prediction of myelotoxicity based on bone marrow radiation-absorbed dose: radioimmunotherapy studies using ⁹⁰Y- and ¹⁷⁷Lu-labeled J591 antibodies specific for prostate-specific membrane antigen. *J Nucl Med*. 2005; 46:850-8.

319. Vegt E, de Jong M, Wetzels JF, Masereeuw R, Melis M, Oyen WJ, Gotthardt M, Boerman OC. Renal toxicity of radiolabeled peptides and antibody fragments: mechanisms, impact on radionuclide therapy, and strategies for prevention. *J Nucl Med.* 2010; 51:1049-58.
320. Voss MJ, Möller MF, Powe DG, Niggemann B, Zänker KS, Entschladen F. Luminal and basal-like breast cancer cells show increased migration induced by hypoxia, mediated by an autocrine mechanism. *BMC Cancer.* 2011;11:158.
321. Walter RB, Press OW, Pagel JM. Pretargeted radioimmunotherapy for hematologic and other malignancies. *Cancer Biother Radiopharm.* 2010; 25:125-42.
322. Wang Z, Götte M, Bernfield M, Reizes O. Constitutive and accelerated shedding of murine syndecan-1 is mediated by cleavage of its core protein at a specific juxtamembrane site. *Biochemistry.* 2005;44:12355-61.
323. Wang S, Yang H, Tong F, Zhang J, Yang D, Liu H, Cao Y, Liu P, Zhou P, Cheng L, Liu M, Guo J. Response to neoadjuvant therapy and disease free survival in patients with triple-negative breast cancer. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2009;36:255-8.
324. Wang P, Heitman J. The cyclophilins. *Genome Biol.* 2005;6:226.
325. Wang CL, MacDonald LR, Rogers JV, Aravkin A, Haseley DR, Beatty JD. Positron emission mammography: correlation of estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 status and 18F-FDG. *AJR Am J Roentgenol.* 2011;197:247-55.
326. Weiden PL, Wolf SB, Breitz HB, Appelbaum JW, Seiler CA, Mallett R, Bjorn MJ, Su FM, Fer MF, Salk D. Human anti-mouse antibody suppression with cyclosporin A. *Cancer.* 1994; 73:1093-7.
327. Wheldon TE, O'Donoghue JA. The radiobiology of targeted radiotherapy. *Int J Radiat Biol.* 1990;58:1-21.
328. Wijdenes J, Vooijs 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;94:318-323.
329. Wijdenes J, Dore JM, Clement C, Vermot-Desroches C. CD138. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2002;16:152-155.
330. Wiksten JP, Lundin J, Nordling S, Lundin M, Kokkola A, von Boguslawski K, Haglund C. Epithelial and stromal syndecan-1 expression as predictor of outcome in patients with gastric cancer. *Int J Cancer.* 2001;95:1-6.
331. Wilder RB, Langmuir VK, Mendonca HL, Goris ML, Knox SJ. Local hyperthermia and SR 4233 enhance the antitumor effects of radioimmunotherapy in nude mice with human colonic adenocarcinoma xenografts. *Cancer Res.* 1993; 53:3022-7.
332. Willmann JK, van Bruggen N, Dinkelborg LM, Gambhir SS. Molecular imaging in drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7:591-607.
333. Wilsie LC, Gonzales AM, Orlando RA. Syndecan-1 mediates internalization of apoE-VLDL through a low density lipoprotein receptor-related protein (LRP)-independent, non-clathrin-mediated pathway. *Lipids Health Dis.* 2006;5:23.
334. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF; American Society of Clinical

- Oncology/College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2007;131:18-43.
335. Wong JYC, Somlo G, Odom-Maryon T, et al: Initial results of a phase I trial evaluating 90yttrium (90Y)-chimeric T84.66 (cT84.66) anti-CEA antibody and autologous stem cell support in CEA-producing metastatic breast cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 13:314, 1998.
336. Wu AM. Antibodies and antimatter: the resurgence of immuno-PET. *J Nucl Med.* 2009;50:2-5.
337. Yang Y, Yaccoby S, Liu W, Langford JK, Pumphrey CY, Theus A, Epstein J, Sanderson RD. Soluble syndecan-1 promotes growth of myeloma tumors in vivo. *Blood.* 2002;100:610-7.
338. Yang Y, MacLeod V, Dai Y, Khotskaya-Sample Y, Shriver Z, Venkataraman G, Sasisekharan R, Naggi A, Torri G, Casu B, Vlodavsky I, Suva LJ, Epstein J, Yaccoby S, Shaughnessy JD Jr, Barlogie B, Sanderson RD. The syndecan-1 heparan sulfate proteoglycan is a viable target for myeloma therapy. *Blood.* 2007;110:2041-8.
339. Yang N, Mosher R, Seo S, Beebe D, Friedl A. Syndecan-1 in breast cancer stroma fibroblasts regulates extracellular matrix fiber organization and carcinoma cell motility. *Am J Pathol.* 2011;178:325-35.
340. Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, Schlom J. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res.* 1992; 52:3402-8.
341. Zalutsky MR, Vaidyanathan G. Astatine-211-labeled radiotherapeutics: an emerging approach to targeted alpha particle therapy. *Curr Pharm Design* 2000;6:1433–55.
342. Zalutsky M, Reardon D, Akabani G, Friedman A, Friedman H, Herndon J, et al. Astatine-211 labeled human/mouse chimeric anti-tenascin monoclonal antibody via surgically created resection cavities for patients with recurrent glioma: Phase I study. *Neuro-Oncol* 2002;4:S103.
343. Zalutsky MR. Current status of therapy of solid tumors: brain tumor therapy. *J Nucl Med.* 2005; 46 Suppl 1:151S-6S.
344. Zhan F, Tian E, Bumm K, Smith R, Barlogie B, Shaughnessy J Jr. Gene expression profiling of human plasma cell differentiation and classification of multiple myeloma based on similarities to distinct stages of late-stage B-cell development. *Blood.* 2003;101:1128-40.
345. Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, Epstein J, Yaccoby S, Sawyer J, Burington B, Anaissie E, Hollmig K, Pineda-Roman M, Tricot G, van Rhee F, Walker R, Zangari M, Crowley J, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood.* 2006;108:2020-8.

ANNEXES

Dosimetry results suggest feasibility of radioimmunotherapy using anti-CD138 (B-B4) antibody in multiple myeloma patients

Caroline Rousseau · Ludovic Ferrer · Stéphane Supiot ·
Manuel Bardiès · François Davodeau ·
Alain Faivre-Chauvet · Pierre Baumgartner ·
John Wijdenes · Marie Lacombe · Jacques Barbet ·
Thierry Guillaume · Philippe Moreau ·
Jean Luc Harousseau · Françoise Kraeber-Bodéré ·
Michel ChereI

Received: 29 November 2011 / Accepted: 13 February 2012
© International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM) 2012

Abstract Syndecan-1 (CD138), a heparan sulfate proteoglycan, is constantly expressed on tumor cells in multiple myeloma (MM). This surface antigen is an attractive candidate for targeted therapy, especially radioimmunotherapy (RAIT). We report preliminary biodistribution and dosimetry results obtained in refractory MM patients in a phase I/II RAIT study using iodine-131-labeled anti-CD138 (B-B4) monoclonal antibody (mAb). Four patients with progressive disease were enrolled after three lines of therapy. They received 370 MBq (20 mg/m²) of ¹³¹I-B-B4 for the dosimetry study. Each patient underwent a whole body (WB) CT

and four WB emission scans at days D0, D1, and D3–4. Images were corrected for attenuation and scatter to assess doses absorbed by organs and bone marrow (BM). Blood and urine samples were additionally collected. Dosimetry was conducted using the MIRD method. Images obtained 1 h after ¹³¹I-B-B4 injection showed high BM and liver uptake without kidney uptake. The BM uptake confirmed BM involvement as detected by pre-inclusion FDG PET/CT. Absorbed doses were calculated at 2.03±0.3 mGy/MBq for the liver, 1.10±0.9 mGy/MBq for the kidneys, and 0.52±0.20 mGy/MBq for the BM. Grade III thrombocytopenia

C. Rousseau (✉) · P. Baumgartner · M. Lacombe ·
F. Kraeber-Bodéré · M. ChereI
Nuclear Medicine Department,
Comprehensive Cancer Center ICO Gauducheau,
IRCNA,
Saint Herblain, France
e-mail: caroline.rousseau@ico.unicancer.fr

C. Rousseau · L. Ferrer · S. Supiot · M. Bardiès · F. Davodeau ·
A. Faivre-Chauvet · J. Barbet · F. Kraeber-Bodéré · M. ChereI
Cancer Research Center CRCNA, Nantes University,
INSERM UMR 892,
Nantes, France

L. Ferrer
Medical Physics Department,
Comprehensive Cancer Center ICO Gauducheau,
IRCNA,
Saint Herblain, France

S. Supiot
Radiotherapy Department,
Comprehensive Cancer Center ICO Gauducheau,
IRCNA,
Saint Herblain, France

A. Faivre-Chauvet · F. Kraeber-Bodéré
Nuclear Medicine Department, University Hospital,
Nantes, France

J. Wijdenes
Diaclone,
Besancon, France

T. Guillaume · P. Moreau · J. L. Harousseau
Hematology Department, University Hospital,
Nantes, France

J. L. Harousseau
Comprehensive Cancer Center ICO Gauducheau,
IRCNA,
Saint Herblain, France

was documented in two cases (highest BM-absorbed doses), and no grade IV hematological toxicity was observed. Therefore, autologous stem cells were not infused. One patient out of four experienced partial response, with 60% reduction of M-spike on serum electrophoresis, and total relief of pain, lasting for 1 year. This patient was able to go back to work. In this proof of concept study based on dosimetry, we show that MM RAIT is feasible using the anti-CD138 antibody. It would be of great interest to perform a RAIT phase I/II trial with a humanized anti-CD138 mAb with increased doses and systematic autologous stem cell infusions to overcome hematological toxicity and achieve efficacy.

Keywords Multiple myeloma · Dosimetry · Syndecan-1 · CD138 · Monoclonal antibody · Radioimmunotherapy

Introduction

Multiple myeloma (MM) is an aggressive and deadly hematologic malignancy affecting plasma cells that reside predominantly in the bone marrow (BM). MM represents about 1% of all cancers and 10% of hematologic malignancies [1]. Despite significant progress made in the last 20 years, MM still has a poor prognosis, often requiring aggressive treatment [2] and innovative therapeutic options. The emergence of new agents such as proteasome inhibitors (bortezomib) and immunomodulators (thalidomide and lenalidomide) has led to real progress in the management of some patients. The success of these therapies is partly due to their impact on the tumor microenvironment [3]. This is because interactions between myeloma cells and bone lead to disease progression and are also important in mediating drug resistance [4–7], making the microenvironment of MM the target of new therapeutic strategies.

Heparan sulfate proteoglycans are known to regulate the initiation and progression of some cancers [8]. Syndecan-1 (CD 138) is a cell surface heparan sulfate-bearing proteoglycan that plays an important role in regulating MM [7]. Syndecan-1 is expressed at relatively high levels on the surface of most MM cells [9–11] but is not expressed by normal cells in the bone marrow [12]. However, the origin of clonogenic/tumorigenic myeloma cells remains controversial, and it is currently unclear whether they are B cells, plasmablasts, or plasma cells. Expression of CD19, CD20, and CD138 clearly distinguishes B cells (CD19⁺CD20⁺CD138⁻) from plasmablasts (CD19⁺CD20⁻CD138⁻) and plasma cells (CD19^{+/-}CD20⁻CD138⁺) [13]. Matsui et al. suggested that clonogenic cells in human myeloma cell lines and in patient samples were of B cell origin based on their phenotype, i.e., CD19⁺CD20⁺CD138⁻, and that CD138⁺ primary myeloma cells did not form colonies [14]. However, more recent reports

argue against a B cell origin of clonogenic myeloma cells. For example, Rasmussen et al. showed that clonotypic B cells from patients do not have the hallmarks of malignancy [15]. Moreover, Jakubikova et al. showed that CD138⁻ myeloma cells are rare in human myeloma cell lines and do not have clonogenic properties [16]. Recently, Chiron et al. showed that rare clonogenic cells from the blood of patients in the leukemic phase are CD138⁺ and that CD138⁻ cells are unable to form colonies [17]. The latter group also confirmed that annexinV⁻CD138⁻ cells represent less than 1% of human myeloma cell lines and thus cannot account for the spontaneous formation of myeloma colonies [17]. The extracellular domain of the syndecan-1 proteoglycan can be cleaved from the cell surface by sheddases, and high levels of shed syndecan correlate with a poor prognosis in MM patients [18]. The shed syndecan-1 is biologically active and can participate in regulating many cellular processes, including MM growth [19, 20]. Because of its high level of expression by MM cells, syndecan-1 has been explored as a candidate antigen for antibody targeting. The B-B4 antibody recognizes both the intact CD138 molecule and the core protein (with the heparin sulfate chains removed) and targets the same or closely related epitopes. B-B4 preferentially binds to membrane-bound versus soluble CD138 [21]. It is a murine IgG1 monoclonal antibody (mAb) that binds to a linear epitope between residues 90 to 95 of the core human protein [22], although there is no data in the literature on the potential binding of B-B4 on the soluble form of CD138. However, B-B4 seems unable to bind soluble CD138 if it is not previously paired to another antibody because it would involve a conformational change of the molecule. (Dr Wijdenes, Dr. Klein, personal communications).

MAbs are emerging as important tools for cancer therapy, particularly for the treatment of hematologic malignancies. The selective targeting of radionuclides and toxins to cancer cells using mAb is a subject of considerable interest. Moreover, radioimmunotherapy (RAIT) for lymphoma using two radio-labeled anti-CD20 mAbs has been approved by the Food and Drug Administration [23]. The cellular organization of MM in single cells or small clusters with its well-differentiated antigenic expression makes it particularly suited for RAIT. The aim of this preliminary study was to assess the biodistribution and absorbed doses of ¹³¹I-B-B4 (mouse anti human-CD138) in four refractory MM patients included in a phase I/II RAIT trial.

Patients and methods

Eligibility criteria

Patients were eligible if they were >18 years of age, with relapsed or refractory disease after at least three lines of therapy for multiple myeloma (>10% plasma cells on a previous

myelogram) associated with secretion of monoclonal immunoglobulin. Bone marrow involvement was evaluated by MRI and FDG PET/CT. For entry into the study, patients needed to be at least 4 weeks beyond any major surgery, external radiotherapy, or chemotherapy and have had no bisphosphonate infusion 2 weeks prior to RAIT, with the exception of treatment started more than 3 months previously. Pregnant or breast-feeding women were excluded, as well as patients with known intercurrent cancer. The protocol was approved by the local ethics committee. All patients gave written informed consent.

Antibody labeling and administration

Diaclone (Besançon, France) kindly provided the murine B-B4 anti-CD138 IgG1 mAb. Radiolabeling of B-B4 with ^{131}I was performed using the iodogen method under sterile conditions as described previously [24]. The ^{131}I -labeled antibody was purified by addition of sterile anionic exchanger (DOWEX A; Aldrich) directly into the reaction vial. Resin with free iodine was discarded by filtration through a 0.22- μm sterile filter. The specific activity was 200 MBq/mg. A fraction was analyzed by ITLC-SG chromatography with 10% trichloroacetic acid in water as the solvent. Radiolabeled antibodies were injected only if the radiochemical purity was more than 95%.

Patients received two infusions of ^{131}I -B-B4 2 weeks apart, the first for the dosimetry evaluation and the second for the therapeutic evaluation. For the dosimetry study, the patients were injected with 370 MBq (20 mg/m²) of ^{131}I -B-B4. For the therapeutic analysis, the activity of ^{131}I -B-B4 was successively escalated to 0.555, 0.74, 0.925, 1.11, and 1.295 GBq/m². Premedication consisted of corticosteroids and antihistamines. Vital signs were monitored before infusion, 5 min after the start of the infusion, and 2 h after the end of the infusion.

A conventional clinical, biological, and imaging follow-up was additionally performed. Hematological toxicity was scored according to version 3.0 of the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria.

Blood and urine sampling

A total of ten blood samples were drawn for pharmacokinetic analyses, between 0.5 h and 7 days post-infusion. Blood samples were collected in serum-separator tubes, and 0.1 to 0.2 mL of serum was analyzed for ^{131}I activity using a gamma scintillation counter (Packard COBRA II Auto Gamma Canberra). Urine samples were collected between D0 and D3. Scintillation counters were precalibrated against known standards to determine counting efficiencies with automatic background subtraction. Time activity curves were fitted by mono-

or biexponential functions using Gnuplot software (www.gnuplot.info) to derive biological and effective half-life [25].

Imaging protocol

Emission scans were performed on a Millennium VG Hawkeye SPECT/CT system with a 1.58-mm-thick NaI (TI) crystal manufactured by GE Healthcare. CT scans were performed with the Discovery LS PET/CT system installed in the same nuclear medicine department at the ICO Gauducheau Cancer Center (St Herblain, France). Step and shoot whole body (WB) immunoscintigraphy was recorded at D0 (1 h post-infusion before patient voiding), D1, D2, D3, and D7, on a Millennium VG Hawkeye camera (GEHC, Milwaukee) using high energy collimators. The images were acquired with three energy windows: one 20% wide open, centered in the main photopeak, and the two others 4% open wide, both sided to this first window to achieve a Compton scattering correction [26, 27].

Quantification and dosimetric study

Absorbed dose estimations were carried out for the tumor site(s) as well as various organs (lungs, kidneys, liver, spleen, and trabecular bone in lumbar vertebrae L2 to L4). The dosimetry study was performed using CT scan images, scintigraphic WB images, and pharmacokinetic data.

Cross-sectional CT imaging was performed with two objectives: first, to determine organ and tumor masses by manual or automatic segmentation with an ITK-SNAP [28], and second, to generate a transmission image to correct for attenuation of WB emission using a software-developed “in-house” [29]. This program generates a two-dimensional map where each pixel contains the attenuation factor, as the sum of the attenuation coefficients along the direction of projection. The attenuation coefficients are inferred from a previously performed calibration scan which converts Hounsfield units to attenuation factors at the energy of the ^{131}I .

Acquired anterior and posterior WB images were used to derive geometric mean (GM) images. All GM images were registered against the WB attenuation correction factor image [24]. Organ and tumor kinetic activities assessed from region of interests (ROIs) automatically derived from the previously segmented CT scan were fitted by mono- or biexponential curves to estimate cumulated activities inside the organs. Cumulated activities and patient organ masses were used as inputs to OLINDA software/XM [30] to calculate absorbed doses to organs identified on the CT scan. Doses absorbed by tumors, when identified on CT images, were estimated by considering only the contribution due to non-penetrating radiation. Blood sampling data were then used to determine the dose to the bone marrow using the method described by the MIRD committee [31].

Toxicity evaluation and tumor response

Toxicity was graded according to version 3.0 of the NCI Common Toxicity Criteria. The toxicity in all patients was checked by a physical examination 15 and 30 days after RAIT and by monitoring complete peripheral blood cell counts and renal and hepatic functions at 8 and 15 days and 1, 3, 6, and 12 months after therapy. Tumor responses were assessed at 1, 3, 6, and 12 months after treatment. In addition to physical examinations, urine and serum immunoglobulin levels and PET/CT FDG were used to assess the therapeutic response.

The biological response was defined as follows:

- Complete response—complete disappearance of the immunoglobulin peak;
- Major partial response—decrease in the immunoglobulin peak greater than 75%;
- Moderate partial response—decrease in the immunoglobulin peak from 50 to 74%;
- Minor partial response—decrease in the immunoglobulin peak from 25% to 49%;
- Stabilization—variation of the immunoglobulin peak \pm 24%;
- Progression—greater than 25% increase in the immunoglobulin peak or hypercalcemia or appearance of a new bone lesion.

The metabolic response to treatment was evaluated according to criteria adapted from several publications [32, 33] and defined as follows:

- Complete metabolic responders (CMR)—disappearance of all bone foci which visually become less than or equal to those of the surrounding noise; loss of all extra-osseous foci (equal to or below local background noise);
- Metabolic non responders (MNR)—persistence of bone and/or extra-osseous foci, with an unmodified appearance on visual analysis compared to the initial review;
- Partial metabolic responders—reduction in number and/or intensity uptake and/or size of bone or extra-osseous foci without complete normalization of images;
- Metabolic progression—increase in number and/or size and/or intensity uptake of bone or extra-osseous foci.

Results

Patient characteristics

Three men and one woman, 49–64 years of age, were included for the study (Table 1). At inclusion, MRI and FDG PET/CT imaging detected diffuse bone marrow

involvement in all patients. Moreover, focus lesions were observed in the pelvis and the right clavicle in patient 2, the skull in patient 3, and the mandible in patient 4. Figure 1 shows the FDG PET/CT images recorded in patient 2.

Targeting

Immunoscintigraphies performed after injection of 370 MBq of ^{131}I -B-B4 (Fig. 2) showed high and early diffuse bone marrow uptake throughout the axial skeleton. Focal lesions visualized on FDG PET/CT could be identified only for patient 2 (right iliac, thoracic vertebrae, and clavicle). Intense nonspecific liver uptake was observed for all patients. In addition, three patients had moderate to high thyroid uptake despite Lugol[®] medication. The thyroid was not visible for patient 2 due to substituted hypothyroidism.

Pharmacokinetic and dosimetry study

The average effective half-lives of the monoclonal antibodies B-B4 and WB in the blood of the four patients were 38.3 ± 3 and 30.3 ± 11 h, respectively as described in Table 2. Table 3 shows the median dose absorbed by the organs of interest. The highest dose was observed for the thyroid. The dose absorbed by the liver was 2.13 mGy/MBq [1.77 to 2.55]. When extrapolated to a therapeutic activity of 1 GBq, an average irradiation dose of 2 Gy could be predicted. Irradiation of the kidneys remained moderate with an absorbed dose of 0.72 mGy/MBq [0.66 to 2.48]. The patient who presented the highest dose absorbed by the kidneys (three times higher) did not present any significant changes in kidney function during the posttreatment follow-up monitored by creatinine and urea quantification. The doses absorbed by the spleen and lungs were low; about 0.5 Gy for an extrapolated therapeutic dose of 1 GBq.

Calculations of doses absorbed by the BM are shown in Table 4. According to the blood sample analyses, the median dose absorbed by the BM was 0.20 ± 0.01 mGy/MBq. The median was 0.49 mGy/MBq [0.33 to 0.77] according to the imaging technique. Thus, with the blood analyses, the estimation of dose absorbed by the BM was three times lower than that calculated using the imaging analyses.

Toxicity

No intercurrent events associated with the injection of ^{131}I -B-B4 were observed. Toxicity was evaluated according to version 3.0 of the NCI Common Toxicity Criteria. The toxicity data for patient 4 were not evaluated because the injection therapy was not performed.

No early toxicity, such as severe allergic reactions, deterioration of general condition, or abnormal laboratory tests

Table 1 Patient characteristics

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Sex (M/F)	M	M	M	F
Age (years)	55	60	49	64
Biology				
Albumin (g/l)	46.1	33.3	39.0	54.5
Creatinine ($\mu\text{mol/l}$)	108	98	150	46
$\beta 2$ -microglobulin (mg/l)	1.7	2.8	4.2	2.1
LDH (UI/l)	159	95	391	157
Hemoglobin (g/dl)	12.4	9.2	9.7	11.9
Calcemia (mmol/l)	2.38	2.39	2.33	2.64
Median duration of disease (months)	68	27	39	36
Type of MM	IgG, κ	IgA, κ	IgG, λ	IgG, λ
Plasma cell number	38%	48%	2%	1.5%
Immunoglobulin level at D0 (g/L)	12.4	32.6	13.2	15
Durie–Salmon stage II/III disease	IIA	IIA	IIIB	IIIA
ISS	I	II	II	I
Cytogenetic abnormalities	non	delK13	non	del17p

ISS International Staging System, *delK13* chromosome 13 deletion, *del17p* chromosome 17 p arm deletion

results, was observed after the dosimetric study. Table 5 shows the myelotoxicity for the three patients who underwent injection therapy. A decrease in the concentration of platelets and leukocytes was observed 5–6 weeks after injection. The duration of grade 3–4 for the platelet counts was 11 days (4–39). One patient experienced a grade 3–4 for leukocyte counts, which lasted 2 days. One grade 4 toxicity was also observed (patient 2), for platelets that lasted 2 days. Platelet toxicity was always reversible without requiring transfusion support. No patients presented infectious disease.

Hemoglobin began to fall about 7 weeks after injection, reaching a nadir at 50 days (44–204). Grade 3 toxicity of short duration (median 4 days; range 0–7) was observed in 2 patients. No significant thyroid, kidney, or liver toxicity was observed.

Response to treatment

For the three patients who received the therapeutic injection, no partial or complete biological response was observed based on the immunoglobulin peak. Stabilization of the

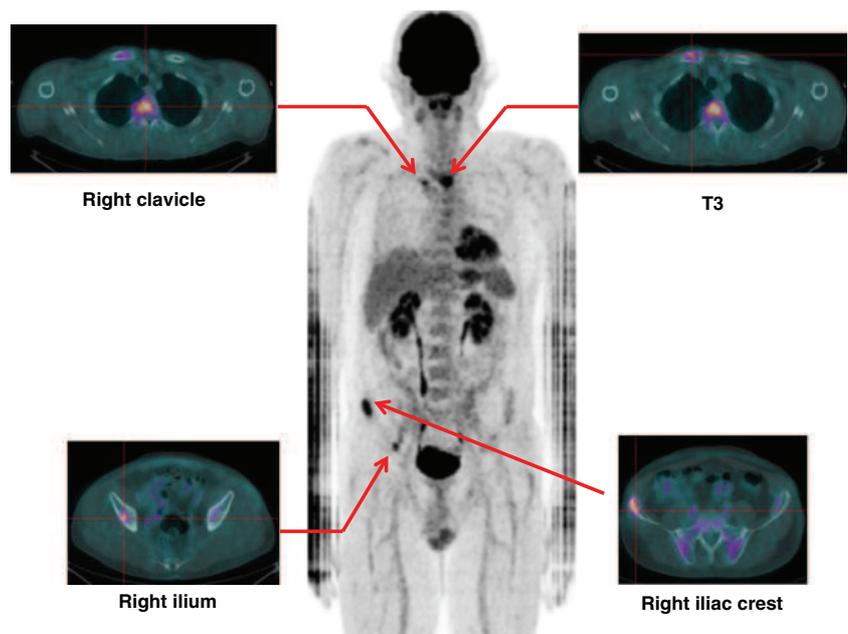
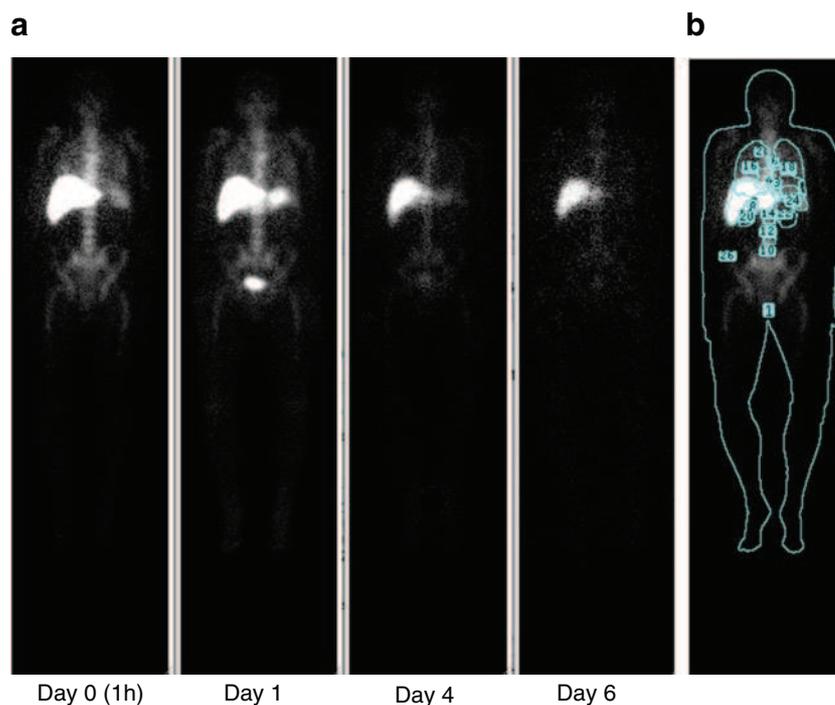
Fig. 1 Initial FDG PET/CT of patient 2

Fig. 2 Anterior whole body immunoscintigraphy. **a** Images recorded at day 0, 1, 4, and 6 after injection of radiolabeled anti-CD138 mAb showed a high uptake in bone marrow and liver. **b** Regions of interest used for dosimetry



peak was observed in patient 1 (Fig. 3a). A significant analgesic effect was observed for a period of 1 year in this patient who had bone pain associated with MM at the time of inclusion, enabling him to return to work full time. In patient 2, the RAIT caused a break in the rate of progression of the monoclonal peak (Fig. 3b).

PET/CT FDG interpretation images were obtained from two patients (patients 1 and 2); the data were incomplete for the other patients. No CMR or MNR was observed. For patient 2, an increase in metabolic lesions was noted, which correlated with the progression of the immunoglobulin peak. For patient 1, PET/CT FDG was non-contributive, since no lesion was detectable on the initial examination.

Discussion

Due to a high level of syndecan-1 expression on MM cells and its absence on the surface of normal marrow cells, syndecan-1 seems to be a relevant target for RAIT in MM. The efficacy of RAIT using anti-syndecan-1 mAb has been demonstrated in preclinical studies, in particular using alpha emitters [34]. For example, when incubated with three multiple myeloma cell lines, B-B4 mAb labeled with ^{213}Bi [35] resulted in high, dose-dependent, cell mortality of myeloma cells, with all cells being killed by 30 kBq/ 10^5 cells. Apoptosis was shown to be involved in the cellular response at a dose of 7.4 kBq/ 10^5 cells and nonspecific mortality was low. Another study showed that ^{213}Bi -labeled B-B4 induced specific mortality and G2/M phase cell cycle arrest, which

Table 2 Mean effective period in the different organs of patients

Organs	T_{eff} (h)	SD (h)
Whole body	38.3	3.0
Liver	35.3	3.8
Bone marrow (L2–L4)	38.5	8.3
Blood	30.3	11.0
Right lung	38.1	5.2
Left lung	38.3	7.8
Spleen	31.5	7.4
Right kidney	44.3	20.5
Left kidney	43.9	21.0
Thyroid	142.6	49.1

Table 3 Organ dosimetry

Organs	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Whole body	0.06	0.07	0.07	0.08
Liver	1.66	2.41	2.04	1.99
Right kidney	0.87	0.83	2.83	0.80
Left kidney	0.35	0.62	1.99	0.50
Right lung	0.51	0.45	0.43	0.76
Left lung	0.41	0.38	0.32	0.65
Spleen	ND	0.76	0.67	0.28
Thyroid	3.20	ND	2.18	4.82

Table 4 Individual bone marrow-absorbed doses

Absorbed BM dose [mGy/MBq]		
Patients	Blood samplings method	Imaging method
1	0.20	0.38
2	0.18	0.61
3	0.21	0.77
4	0.20	0.33
Median	0.20	0.49

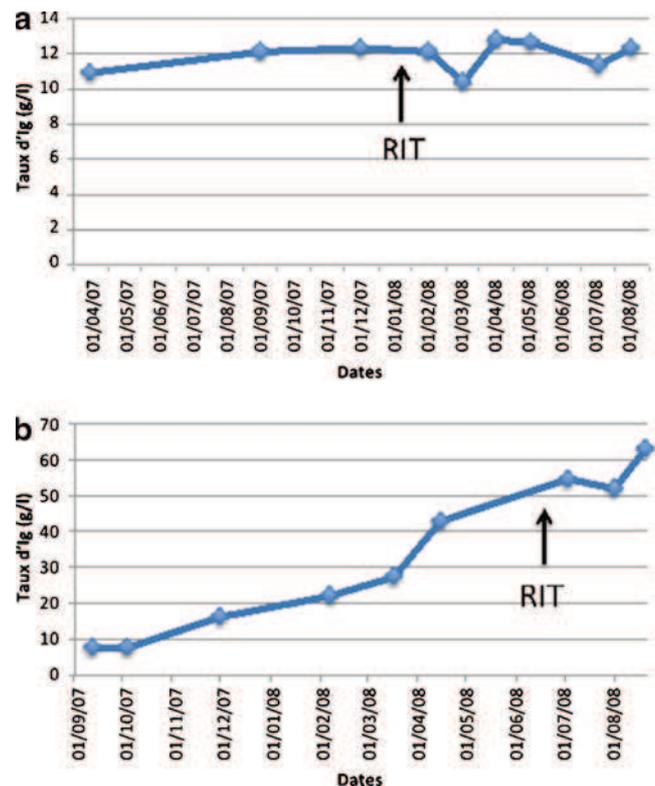
depended on concentration and specific activity [36]. With ^{213}Bi -labeled B-B4, the arrest at the G2/M phase appeared quickly, within 24 h after irradiation, and affected up to 60% of the cells (for 20 nM of ^{213}Bi B-B4 at 1,200 MBq/mg). A more recent study [37] assessed the toxicity and efficacy of ^{213}Bi -labeled rat anti-mouse CD138 antibody in a mouse myeloma 5 T33 implanted in syngeneic C57BL/KaLwRij mice. With 3.7 MBq, a slight and reversible hematological toxicity was observed, associated with significant long-term survival. Given the results of these studies, a phase I trial has been designed to transfer anti-CD138 RAIT into the clinic.

These preliminary results suggest that anti-CD138 RAIT is feasible in MM patients. Although we were unable to demonstrate a therapeutic response, our phase I study enabled us to evaluate toxicity. Unfortunately, we could not go beyond the first step of the study due to the poor quality tests of the antibody. The patients included for the study had previously received intense therapy and had a serious and progressive form of the disease with a high tumor burden. Nevertheless, a parallel can be made with the results of RAIT of solid tumors, which were not encouraging initially because of its application to phase I clinical trial patients with large tumors (>5 cm) subsequent to failure of multiple therapies. To achieve better results, RAIT of solid tumors has been refocused on the treatment of residual disease, or

Table 5 Hematological toxicity after therapeutic injection of ^{131}I -B-B4

	Hematological toxicity grade	Nadir (days)	Duration of du grade 3–4 (days)
Patient 1	Pl=3	39	4
	Hb=1	204	0
	Wc=2	39	0
Patient 2	Pl=4	35	11
	Hb=3	44	7
	Wc=2	44	0
Patient 3	Pl=3	62	39
	Hb=3	50	4
	Wc=3	54	2

Pl platelets, Hb hemoglobin, Wc white cells

**Fig. 3** Evolution of gamma globulin peak after injection of ^{131}I -B-B4 in patients 1 (a) and 2 (b)

localized micrometastatic disease, thus approaching the model of RAIT in hematology. Along these lines, favorable results have been reported for metastatic colorectal carcinoma with RAIT using an anti-CEA mAb for consolidation after surgery [38]. As noted in other studies of RAIT, hematological toxicity is the limiting factor of the injected activity expected in this study [39]. Hematological data are difficult to interpret in the case of MM because it is necessary to distinguish between toxicity related to treatment and disease. In addition, diffuse bone metastases have been shown to increase the risk of hematological toxicity of RAIT [40]. One must remember that the patients in our study had progressive disease and had received multiple lines of treatment which was toxic to the bone marrow. Despite all of this, none of the three patients who received a therapeutic injection of ^{131}I -B-B4 showed any hematologic toxicity requiring transfusion support, hospitalization, or the use of a stem cell graft. No other toxicity was noted for the various organs monitored (liver, thyroid, and kidneys) in these few patients.

The immunoscintigraphy images showed high bone marrow uptake, reflecting the targeting of the MM cells by the radiolabeled mAb. Moreover, the dosimetry study did not predict activity-limiting absorbed doses in normal organs, even in the liver, despite the apparent high uptake observed by immunoscintigraphy. Early high liver uptake was also observed in the MM animal model, together with significant

spleen uptake [37]. Supiot et al. observed B-B4 immunostaining in the liver, lung, and duodenum [36]. In an article about the maytansinoid immunoconjugate B-B4-DM1, Tasone et al. reported a variable staining in the liver: no staining of hepatocytes and a moderate to strong staining in spaces between the hepatocytes or sinusoidal lining cells [41]. In the kidneys, a strong staining in tubules in the cortex and in the medullary region was reported. The glomeruli showed no B-B4 staining. It is possible that the difference observed between models could also be explained by abnormal hematopoiesis in the liver and spleen in the MM model, explaining a higher uptake or different organ distribution of MM cells depending on the cell lines [42].

In this study, two different approaches (imaging and blood-based) were used to evaluate the BM-absorbed dose for the four MM patients undergoing RAIT. The blood-based approach is obviously easier to implement in clinical practice. It requires only blood sampling at various time points after radiopharmaceutical injection and a patient-specific determination of the hematocrit for a given implemented method. This method relies on measuring the activity concentration in blood samples assuming the shape of the biokinetic curve in the BM to be identical to that measured in the blood (no specific uptake in BM) [43]. The image-based approach is methodologically much more demanding. It requires several imaging sessions and the implementation of ad hoc image/data processing. Moreover, it burdens the patient with additional examinations and is more costly in terms of hospital resource requirements [29]. However, in the case of direct bone marrow targeting, the method involving image-based activity quantification should be used, conjugate views or a single view in which the ROI is drawn over the lumbar spines where a known amount of BM is localized [44, 45]. Moreover, in a RAIT study in lymphoma using anti-CD22 [24], the image-based method better predicted hematological toxicity, as already suggested by several authors [46–48]. This reinforces the choice of an image-based method, although complex to use, in diseases targeting bone marrow. Probably due to the participation of the disease in the bone marrow, the image-based method found higher calculated absorbed doses than the blood-based method. This result has been observed previously [29].

For lymphoma patients, the ^{131}I -Tositumomab RAIT regime includes a pre-dose of unlabeled antibody in order to decrease splenic targeting and increase the biologic window of the radiolabeled antibody. The median BM-absorbed dose determined by the blood-based method was 0.65 mGy/MBq [49], whereas in the present study the BM-absorbed dose was 0.20 mGy/MBq. This difference could be explained by the intense hepatic uptake observed with ^{131}I -B-B4. This intense hepatic uptake would probably decrease with a pre-dose of B-B4 antibody, leading to a higher activity in the blood and consequently in the BM.

MM cells are found either isolated in the BM or in small clusters. Among the different beta emitters available, it would be logical to choose ^{131}I for the treatment of MM because the energy of emitted beta particles is distributed within a range of about a millimeter, whereas more energetic beta emitters (^{90}Y , ^{186}Re , and ^{188}Re) deliver their energy over a greater range. This is why we chose ^{131}I for a first clinical application of RAIT in MM (phase I). However, the notion of energy distribution 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 example, in MM, alpha particles have a theoretical advantage over beta particles because of their high linear energy transfer and shorter range of action [50]. Presumably, cell destruction would be more selective and irradiation less harmful to adjacent tissues. Preclinical studies suggest that alpha-radioimmunotherapy (RIT) might be more suitable than beta-RIT for treating single cell tumor models [36], and RAIT with alpha particles should be used for minimal residual disease or micrometastatic disease. Furthermore, antitumor effects of alpha particle immunotherapy may be further enhanced by the use of beta radioisotopes, especially when the disease is advanced, as was the case in this study. Astatine 211, a cyclotron-produced α -emitting radionuclide, has a relatively long half-life (7.2 h) and would therefore be one of the potential candidates for α -targeted therapy [51]. It has physical properties favorable for RAIT and allows functional imaging by X-ray emission with its decay into polonium 211. In addition, the radiation is favorable because more than 99% of the energy of astatine 211 comes from α -particles [52]. Furthermore, the continued overexpression of syndecan-1, the target of B-B4 in progressive MM, suggests that B-B4-alpha-RAIT would be effective even for the treatment of refractory forms of the disease. If B-B4 RAIT showed success in consolidation therapy, there would be a great interest in exploring its use, either as a single agent or as part of a conditioning regimen for autologous stem cell transplantation, such as in lymphoma.

Conclusion

In this proof of concept study, we show that MM RIT with anti-CD138 antibody has appropriate dosimetry according to the infused doses. It would be of great interest to perform a RIT phase I/II trial with a humanized anti-CD138 mAb with increased doses and systematic autologous stem cell infusions to overcome hematological toxicity and to try to achieve higher efficacy.

Conflicts of interest None

References

- Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2004;351(18):1860–73.
- Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*. 2009;23(1):3–9.
- Facon T, Mary JY, Hulin C, Benboubker L, Attal M, Pegourie B, et al. Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial. *Lancet*. 2007;370(9594):1209–18.
- San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2008;359(9):906–17.
- Anderson KC. Targeted therapy of multiple myeloma based upon tumor-microenvironmental interactions. *Exp Hematol*. 2007;35(4 Suppl 1):155–62.
- Caers J, Van Valckenborgh E, Menu E, Van Camp B, Vanderkerken K. Unraveling the biology of multiple myeloma disease: cancer stem cells, acquired intracellular changes and interactions with the surrounding micro-environment. *Bull Cancer*. 2008;95(3):301–13.
- Perez LE, Parquet N, Shain K, Nimmanapalli R, Alsina M, Anasetti C, et al. Bone marrow stroma confers resistance to Apo2 ligand/TRAIL in multiple myeloma in part by regulating c-FLIP. *J Immunol*. 2008;180(3):1545–55.
- Sanderson RD, Yang Y. Syndecan-1: a dynamic regulator of the myeloma microenvironment. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(2):149–59.
- 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*. 1993;81(3):767–74.
- 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*. 1988;106(2):423–30.
- Jourdan M, Ferlin M, Legouffe E, Horvathova M, Liautard J, Rossi JF, et al. The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. *Br J Haematol*. 1998;100(4):637–46.
- Vooijs 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(6):319–28.
- Jego G, Bataille R, Pellat-Deceunynck C. IL-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood*. 2001;97:1817–22.
- Matsui W, Huff CA, Wang Q, Malehorn MT, Barber J, Tanhehco Y, et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood*. 2004;103:2332–6.
- Rasmussen T, Haaber J, Dahl IM, Knudsen LM, Kerndrup G, Lodahl M, et al. Identification of translocation products but not K-RAS mutations in memory B cells from multiple myeloma patients. *Haematologica*. 2010;95:1730–7.
- Jakubikova J, Adamia S, Kost-Alimova M, Klippel S, Cervi D, Daley JF, et al. Lenalidomide targets clonogenic side population in multiple myeloma: pathophysiologic and clinical implications. *Blood*. 2011;117:4409–19.
- Chiron D, Surget S, Maïga S, Bataille R, Moreau P, Le Gouill S, et al. The peripheral CD138+ population but not the CD138- population contains myeloma clonogenic cells in plasma cell leukemia patients. *Br J Haematol*. 2011. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.08904.x.
- 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*. 2000;95(2):388–92.
- Bartlett AH, Hayashida K, Park PW. Molecular and cellular mechanisms of syndecans in tissue injury and inflammation. *Mol Cells*. 2007;24(2):153–66.
- Yang Y, Yaccoby S, Liu W, Langford JK, Pumphrey CY, Theus A, Epstein J, Sanderson RD. Soluble syndecan-1 promotes growth of myeloma tumors in vivo. *Blood*. 2002;100(2):610–7.
- Wijdenes J, Dore JM, Clement C, Vermot-Desroches C. CD138. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2002;16(2):152–5.
- Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C, Post J, Morard F, Vita N, et al. A plasmacyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol*. 1996;94(2):318–23.
- Govindan SV, Goldenberg DM. New antibody conjugates in cancer therapy. *Scientific World J*. 2010;10:2070–89.
- Kraeber-Bodere F, Rousseau C, Bodet-Milin C, Ferrer L, Faivre-Chauvet A, Campion L, et al. Targeting, toxicity, and efficacy of 2-step, pretargeted radioimmunotherapy using a chimeric bispecific antibody and 131I-labeled bivalent hapten in a phase I optimization clinical trial. *J Nucl Med*. 2006;47(2):247–55.
- Williams T, Kelley C. gnuplot 4.2.6. (2009) Available from URL: <http://www.gnuplot.info>. Accessed 18 Feb 2009.
- Ogawa K, Harata Y, Ichihara T, Kubo A, Hashimoto S. A practical method for position-dependent Compton-scatter correction in single photon emission CT. *IEEE Trans Med Imaging*. 1991;10(3):408–12.
- Buvat I, Benali H, Frouin F, Bazin JP, Di Paola R. Target apex-seeking in factor analysis of medical image sequences. *Phys Med Biol*. 1993;38(1):123–38.
- Yushkevich PA, Piven J, Hazlett HC, Smith RG, Ho S, Gee JC, et al. User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: significantly improved efficiency and reliability. *Neuroimage*. 2006;31(3):1116–28.
- Ferrer L, Kraeber-Bodere F, Bodet-Milin C, Rousseau C, Le Gouill S, Wegener WA, et al. Three methods assessing red marrow dosimetry in lymphoma patients treated with radioimmunotherapy. *Cancer*. 2010;116(4 Suppl):1093–100.
- Stabin MG, Siegel JA. Physical models and dose factors for use in internal dose assessment. *Health Phys*. 2003;85(3):294–310.
- Siegel JA, Thomas SR, Stubbs JB, Stabin MG, Hays MT, Koral KF, et al. MIRD pamphlet no. 16: techniques for quantitative radiopharmaceutical biodistribution data acquisition and analysis for use in human radiation dose estimates. *J Nucl Med*. 1999;40(2):37S–61S.
- Bartel TB, Haessler J, Brown TL, Shaughnessy Jr JD, van Rhee F, Anaissie E, et al. F18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the context of other imaging techniques and prognostic factors in multiple myeloma. *Blood*. 2009;114:2068–76.
- Zamagni E, Nanni C, Patriarca F, Englaro E, Castellucci P, Geatti O, et al. A prospective comparison of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computed tomography, magnetic resonance imaging and whole-body planar radiographs in the assessment of bone disease in newly diagnosed multiple myeloma. *Haematologica*. 2007;92:50–5.
- 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(9):1341–51.
- Couturier O, Faivre-Chauvet A, Filippovich IV, Thedrez P, Sai-Maurel C, Bardies M, et al. Validation of 213Bi-alpha radioimmunotherapy for multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 1999;5(10 Suppl):3165s–70s.
- Supiot S, Faivre-Chauvet A, Couturier O, Heymann MF, Robillard N, Kraeber-Bodere F, 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(4 Suppl):1202–9.
- Cherel M, Gouard S, Gaignerie A, Gaschet J, Bigot-Corbel E, Faivre-Chauvet A, et al. Targeting the CD138 antigen for the

- treatment of multiple myeloma with Bismuth-213. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2009;36 Suppl 2:S194–233. abstract.
38. Liersch T, Meller J, Kulle B, Behr TM, Markus P, Langer C, et al. Phase II trial of carcinoembryonic antigen radioimmunotherapy with ¹³¹I-labetuzumab after salvage resection of colorectal metastases in the liver: five-year safety and efficacy results. *J Clin Oncol*. 2005;23:6763–70.
 39. Devys A, Thedrez P, Gautherot E, Faivre-Chauvet A, Sai-Maurel C, Rouvier E, et al. Comparative targeting of human colon-carcinoma multicell spheroids using one- and two-step (bispecific antibody) techniques. *Int J Cancer*. 1996;67:883–91.
 40. Mirallie E, Vuillez JP, Bardet S, Frampas E, Dupas B, Ferrer L, et al. High frequency of bone/bone marrow involvement in advanced medullary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:779–88.
 41. Tassone P, Goldmacher VS, Neri P, Gozzini A, Shamma MA, Whiteman KR, et al. Cytotoxic activity of the maytansinoid immunoconjugate B-B4-DM1 against CD138+ multiple myeloma cells. *Blood*. 2004;104(12):3688–96.
 42. Vanderkerken K, De Raeve H, Goes E, Van Meirvenne S, Radl J, Van Riet I, Thielemans K, Van Camp B. Organ involvement and phenotypic adhesion profile of 5T2 and 5T33 myeloma cells in the C57BL/KaLwRij mouse. *Br J Cancer*. 1997;76(4):451–60.
 43. Sjögreen-Gleisner K, Dewaraja YK, Chiesa C, Tennvall J, Lindén O, Strand SE, Ljungberg M. Dosimetry in patients with B-cell lymphoma treated with [(90)Y]ibritumomab tiuxetan or [(131)I]tositumomab. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2011;55(2):126–54.
 44. Meredith RF, Shen S, Forero A, LoBuglio A. A method to correct for radioactivity in large vessels that overlap the spine in imaging-based marrow dosimetry of lumbar vertebrae. *J Nucl Med*. 2008;49(2):279–84.
 45. Juweid M, Sharkey RM, Siegel JA, Behr T, Goldenberg DM. Estimates of red marrow dose by sacral scintigraphy in radioimmunotherapy patients having non-Hodgkin's lymphoma and diffuse bone marrow uptake. *Cancer Res*. 1995;55(23 Suppl):5827s–31s.
 46. Siegel JA. Establishing a clinically meaningful predictive model of hematologic toxicity in nonmyeloablative targeted radiotherapy: practical aspects and limitations of red marrow dosimetry. *Cancer Biother Radiopharm*. 2005;20:126–40.
 47. DeNardo DA, DeNardo GL, O'Donnell RT, et al. Imaging for improved prediction of myelotoxicity after radioimmunotherapy. *Cancer*. 1997;80:2558s–66s.
 48. Sgouros G, Stabin M, Erdi Y, et al. Red marrow dosimetry for radiolabeled antibodies that bind to marrow, bone, or blood components. *Med Phys*. 2000;27:2150–64.
 49. Research Triangle Park, NC: GlaxoSmithKline. Bexxar prescribing information [package insert]. 2005. Available at: http://us.gsk.com/products/assets/us_bexxar.pdf
 50. Chatterjee M, Chakraborty T, Tassone P. Multiple myeloma: monoclonal antibodies-based immunotherapeutic strategies and targeted radiotherapy. *Eur J Cancer*. 2006;42(11):1640–52.
 51. Zalutsky MR, Bigner DD. Radioimmunotherapy with alpha-particle emitting radioimmunoconjugates. *Acta Oncol*. 1996;35(3):373–9.
 52. Couturier O, Supiot S, Degraef-Mouglin M, Faivre-Chauvet A, Carlier T, Chatal JF, et al. Cancer radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2005;32(5):601–6s14.

Cancer du Sein Triple Négatif : Ciblage du Syndecan-1 pour la Radioimmunothérapie et l'ImmunoTEP

La première partie de ce travail avait pour objectif d'évaluer la toxicité et l'efficacité de la radioimmunothérapie (RIT) avec l'anticorps monoclonal humain B-B4 (anti-CD138) marqué à l'iode 131 dans un modèle de souris nude greffée avec une lignée humaine de cancer du sein triple négatif MDA-MB-468. Malgré l'expression relativement faible du nombre de sites antigéniques CD138 par cellule ($B_{max}=1,19.10^4 \pm 9,27.10^2$), la fixation tumorale du 125I-B-B4 a atteint un maximum de 14% de l'activité injectée par gramme, 24h après l'injection. La toxicité avec le 131I-B-B4 a été hématologique. A la dose maximale tolérée déterminée à 22,2 MBq, 3 réponses partielles et 5 réponses complètes ont été obtenues chez les 8 souris traitées, avec une absence de reprise évolutive à 95 jours pour 3 d'entre elles. La RIT avec le 131I-B-B4 apparaît donc une alternative thérapeutique du cancer du sein triple négatif métastatique. La deuxième partie de ce travail avait pour objectif de comparer l'immuno-TEP (iTEP) avec le 124I-B-B4 à l'imagerie FDG et FLT et aux données de pharmacocinétique et de biodistribution obtenues avec le 124I-B-B4, afin de valider l'iTEP ciblant le CD138 dans le même modèle de cancer du sein triple négatif. Les données de pharmacocinétique obtenues à partir de l'imagerie ou de la biodistribution au 124I-B-B4 ont été concordantes. Les rapports Tumeur/Muscle en TEP FDG et TEP FLT ont été respectivement de $1,67 \pm 0,24$ et $5,28 \pm 0,49$, inférieurs à celui calculé pour l'iTEP ($12,17 \pm 0,62$ à 96h). Ce travail confirme la faisabilité de l'approche d'iTEP avec le 124I-B-B4 pour les carcinomes mammaires triples négatifs, avec des intérêts potentiels diagnostiques et pré-thérapeutiques.

MOTS-CLES: RADIOIMMUNOTHERAPIE. IMMUNOTEP. CANCER DU SEIN TRIPLE NEGATIF. SYNDECAN-1. ANTICORPS MONOCLONAL.

Triple Negative Breast Cancer: Syndecan-1 Targeting for Radioimmunotherapy and ImmunoPET

The objective of the first part of this research was to evaluate the toxicity and the efficiency of radioimmunotherapy (RIT) with a monoclonal human anti-body B-B4 (anti-CD138) labelled with iodine 131 in a nude mouse model grafted with a human line of triple-negative breast cancer MDA-MB-468. Despite the relatively low expression of the number of CD138 antigen sites per cell ($B_{max}=1,19.10^4 \pm 9,27.10^2$), the tumoral attachment of 125I-B-B4 reached a maximum of 14% of activity injected per gram, 24 hours after the injection. Toxicity with 131I-B-B4 was haematological. With the maximum tolerated dose determined to be 22.2 MBq, three partial and five complete responses were obtained on eight treated mice, with an absence of relapse at 95 days for three of them. RIT with 131I-B-B4 would therefore appear to be an alternative therapy for triple-negative metastatic breast cancer. The objective of the second part of this research was to compare the iPET with 124I-B-B4 with FDG and FLT imaging and with pharmacokinetic and biodistribution data obtained with 124I-B-B4, in order to validate iPET targeting CD138 in the same model of triple-negative breast cancer. The pharmacokinetic data obtained from imaging or biodistribution with 124I-B-B4 was concordant. Tumor/Muscle ratios in FDG PET and FLT PET were respectively 1.67 ± 0.24 and 5.28 ± 0.49 , lower than that calculated for iPET (12.17 ± 0.62 at 96 hours). This research confirms the feasibility of the iPET approach with 124I-B-B4 for triple-negative mammary carcinomas with potential diagnostic and pre-therapeutic interests.

Key-Words: RADIOIMMUNOTHERAPY. IMMUNOPET. TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER. SYNDECAN-1. MONOCLONAL ANTIBODY.