



HAL
open science

Contribution des effets ciblés et non ciblés en radioimmunothérapie alpha et Auger de carcinoses péritonéales

Riad Ladjohounlou

► **To cite this version:**

Riad Ladjohounlou. Contribution des effets ciblés et non ciblés en radioimmunothérapie alpha et Auger de carcinoses péritonéales. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2016. Français. NNT : 2016MONTT037 . tel-01508855

HAL Id: tel-01508855

<https://theses.hal.science/tel-01508855>

Submitted on 14 Apr 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'**UNIVERSITE DE MONTPELLIER**

Préparée au sein de l'école doctorale **Science
Chimique et Biologique pour la Santé**
Et de l'unité de recherche **INSERM U1194**

Spécialité : **Radiobiologie**

Présentée par **Riad LADJOHOUNLOU**

**Contribution des effets ciblés et non ciblés
en radioimmunothérapie alpha et Auger de
carcinomes péritonéales**

Soutenue le **06 décembre 2016** devant le jury composé de

M. Jean-Philippe VUILLEZ, PUPH, Université de Grenoble

Président du Jury

Mme Claire RODRIGUEZ-LAFRASSE, PUPH, Université
Claude Bernard Lyon 1

Rapporteur

M. Éric DEUTSCH, PUPH, Institut Gustave Roussy de Villejuif
Mme Céline GONGORA, DR2, IRCM

Rapporteur

Examineur

M. Edouard AZZAM, Professor in Department of Radiology at
Rutgers University - New Jersey Medical School

Examineur

M. Jean-Pierre POUGET, CR1, IRCM

Directeur de thèse

M. Vincent BOUDOUSQ, MCU/PH, IRCM

Co-directeur de thèse



«Déjà essayé. Déjà échoué. Peu importe.
Essaie encore. Echoue encore.
Mais échoue un peu moins.»

Samuel Beckett.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse et notamment, les Pr Claire Rodriguez-Lafrasse et Eric Deutsch, d'avoir accepté en tant que rapporteurs, d'apporter un regard critique à ce rapport de thèse.

Je tiens aussi à remercier les examinateurs : le Pr Jean-Philippe Vuillez, le Pr Edouard Azzam et le Dr Céline Gongora.

Merci d'avoir consacré un peu de votre temps pour lire ma thèse.

Je remercie le Dr Jean Pierre Pouget pour m'avoir donné l'opportunité de faire ma thèse dans son équipe. A la suite de mon stage de master 2, réalisé dans ton équipe, tu as décidé de me garder pour la thèse. Je puis aujourd'hui dire que c'était la meilleure décision car, j'avais le choix entre faire la thèse à Montpellier ou à Toulouse. Pendant toutes ces années j'ai beaucoup appris de toi sur le métier de chercheur au point qu'aujourd'hui devenir physicien médical comme c'était mon objectif auparavant, n'est plus d'actualité. Oui je vais continuer dans la recherche, en radiobiologie qui est une discipline qui m'a toujours passionné. Merci infiniment pour toutes les connaissances que tu as partagé avec moi.

Merci à Isabelle Navarro-Teulon. Isa comme j'ai l'habitude de t'appeler tu as été comme une maman pour moi durant toutes ces années. Tes conseils étaient toujours les bienvenus. Tu as toujours été au petit soin pour moi. Que ce soit professionnellement ou personnellement, j'ai beaucoup appris avec toi. Je me suis toujours bien senti avec vous dans l'équipe j'étais en famille, j'ai été complètement adopté. Jean Pierre et toi vous me l'avez encore prouvé par votre acte lors de ce moment difficile que je viens juste de traverser. INFINIMENT MERCI

Un immense merci au Dr Vincent Boudousq. Merci Vincent pour ton aide pour les manips et surtout pour tous les conseils que j'ai pu recevoir de toi.

Alex, on se connaît depuis le master de PhyMed ; depuis tu es passé d'un camarade de classe à un véritable ami. Nous avons partagé beaucoup de choses ensemble : le stage de M2 et la thèse dans l'équipe de Jean Pierre, les différents congrès en France ou à l'étranger, des soirées, des apéros...pleins de bons moments que je garderai en moi. Merci également pour l'aide que tu m'apportais dans les manips notamment quand le générateur de plomb ou de bismuth était là et qu'il fallait aller le plus vite possible pour ne pas perdre trop d'activité. Aujourd'hui c'est moi qui soutiens ma thèse en premier, on n'aurait pas pu le faire ensemble comme cela a toujours été. Mais très bientôt tu deviendras aussi Dr Pichard. Bon courage pour la rédaction.

Un grand merci au Dr Salomé Paillas. Quand j'ai débuté mon stage de master 2 dans l'équipe je ne savais pas grande chose du travail sur une paillasse de labo. C'est avec toi que j'ai appris la majorité des techniques biologiques que je maîtrise aujourd'hui. J'ai également appris pleins d'autres choses de toi, merci pour les soirées, les sorties et les week-ends passés avec Alex, Pauline et tous les autres.

Merci à toi Marion pour ta bonne humeur communicante et surtout pour les explications que tu ne manquais pas de me fournir sur les quelques lacunes biologiques que j'avais. Merci aussi pour toutes les connaissances diverses sur la culture française que tu as bien voulu partager avec moi.

Merci au Dr Catherine Lozza, au Dr Emmanuel Deshayes. J'ai toujours pu compter sur vous à chaque fois que je venais vers vous que ce soit pour une manip ou autre. Sincèrement merci. Samuel, je ne t'oublie pas, merci pour l'aide que tu m'as apportée durant ton cours séjour dans l'équipe. C'est grâce à toi notamment si je peux utiliser le logiciel ImageJ si facilement ! Pauline je te remercie aussi pour ton aide dans les manips, je suis certain que tout se passera très bien pour toi pour la thèse.

Merci à toutes les personnes de la recherche avec qui j'ai eu la chance de travailler. Je pense tout particulièrement à Geneviève Heintz, qui a sans cesse tout fait pour m'aider et qui au-delà de son travail toujours bien fait, a toujours été à l'écoute des étudiants sans aucun parti pris ni jugement. Merci à Sabine Bousquié, qui a pris la relève une fois Geneviève parti, merci pour ton aide. Un spécial merci à toute la bande des doctorants de la fameuse salle des étudiants : Charline, Pauline, Romain, Rana, et Maeva qui nous a rejoints depuis 1 an. On formait un très bon groupe où régnait toujours la bonne humeur ; les petits dej du vendredi, les pauses café, les sorties skis, les apéros et j'en passe merci pour tous ces bons moments qui nous faisaient oublier les manips foireuse. Bon courage à vous les amis ; plus que quelques mois pour la plupart de vous et vous serez libérés...

Alex Junior mon partenaire de boxe je ne t'oublie pas. Ne t'inquiète pas, le round final est prévu avant la soutenance. Tu pourras ainsi manger les bananes...

Un merci spécial à toi... J'espère que tu te reconnaîtras entre ces lignes. Quel plaisir pour moi de te connaître et de savoir que je peux toujours compter sur toi. Ton soutien, tes prières et surtout ta présence pendant les bons et mauvais moments m'ont toujours motivé. Comme tu le sais sûrement je t'apprécie ENORMEMENT.

Je tiens aussi à remercier mes amis de l'association des béninois de Montpellier Lynda, Kaila, Cacylde, Happy, Stéphane, Voltaire, Hugues et Abel. Merci pour votre soutien. Florentine merci pour ta patience et ta compréhension. Tu as supporté mes humeurs, mes tracas et mes angoisses dues à la rédaction de ce manuscrit. Merci !

Enfin je voudrais remercier mes parents. Vous avez toujours su que je voulais faire de longues études. J'ai toujours eu votre soutien ; vous m'avez laissé partir seul pour un pays où je ne connaissais personne. Merci pour le sacrifice consenti et pour toutes vos prières qui m'ont toujours accompagnée. Je n'oublie pas mes sœurs Firdaus et Koulsoum et mon grand frère Jules vous qui m'avez toujours encouragé. Je VOUS AIME.

Papa, maman, je vous dédie cette thèse.

Seigneur je te remercie pour ta présence et ta grâce qui est sans cesse, renouvelée dans ma vie.

Amen

Liste des abréviations

AcM: anticorps monoclonal
ADN: acide désoxyribonucléique
ADCC: antibody dependent cellular cytotoxicity
ABC: agent bifonctionnel chélatant
AES: affinity enhancement system
Ag: antigène
AJCC: american joint committee on cancer
AMH: hormone anti-müllérienne
AMHRII: récepteur de type II de l'hormone anti-müllérienne
AMM: autorisation de mise sur le marché
A-SMase: sphingomyélinase acide
ATCC: american type cell culture collection
ATM: ataxia-telangiectasia mutated
ATR: ATM and rad 3-related
Bcl-2: B-cell lymphoma 2
BD: base damage = dommage des bases
BER: base excision repair
B-NHEJ: Back-up NHEJ
BNIP3: BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa interacting protein 3
BRCA1/2: breast cancer 1/2
BR: branche ratio = ratio d'embranchement
CA-125: carbohydrate antigen 125
CDC: complement dependent cytotoxicity
Cdk: cyclin-dépendent kinases
CDR: complementary determining regions
CE: capture électronique
CEA: antigène carcino-embryonnaire
CHIP: chimiothérapie associée à l'hyperthermie délivrée par voie intrapéritonéale
CI: conversion interne
CIPR: commission internationale de protection radiologique
CM: conditioned medium = milieu conditionné
COX-2: cyclooxygénase 2
CPM: coup par minute
Cx: connexine
DAR : digital autoradiographie
DMSO: diméthylsulfoxyde
DNA-PKcs: DNA-PK catalytic subunit
DNA-PK: DNA-activated protein kinase
D-NHEJ: DNA-PK dependent NHEJ
DOTA: acide tétraacétique 1,4,7,10 tetraazacyclododecane macrocyclique
DSB: double Strand Break = cassure double brins de l'ADN
DTPA: acide diéthylène triamine pentaacétique
EBR: efficacité biologique relative
EDTA: éthylène diamine tétra-acétique
EOC: epithelial ovarian cancer
ERK: extracellular signal-regulated kinases
EGF: facteur de croissance épidermique
FAK: focal adhesion kinase

FACS: fluorescence-activated cell sorting = cytométrie en flux
FcγRn: récepteur Fc néonatal
FIGO: fédération internationale de gynécologie et d'obstétrique
FSH: hormone folliculo-stimulante
GJIC: gap junctional intercellular communication
HER2: Human Epidermal Receptor 2
HES: hémateine eosine safran
HIF: hypoxia-inducible factors
H₂O₂: peroxyde d'hydrogène
HDV: histogramme dose volume
HNPCC: hereditary non-polyposis colorectal cancer
HR: homologous recombination = recombinaison homologue
IHC: immunohistochimie
IP: intrapéritonéale
Ig: immunoglobuline
IF: immunofluorescence
IFN: interférons
IL: interleukines
iNOS: oxyde nitrique synthase
JNK: c-jun amino-terminal kinase
LCN2: lipocalin 2
LH: hormone lutéinisante
LMDS: locally multiply damaged = lésions multiples localisées
MAPK: mitogen-activated protein kinase
MBCD: méthyl-β-cyclodextrine
MIF: macrophage inhibitor factor
MIRD: medical internal radiation dose
MN: micronoyaux
MMR: mismatch repair = réparation des mésappariements
MRN: Mre11/Rad50/Nbs1
MSK: mitogen- and stress-activated protein kinase
MTA: activité maximale tolérée
NAC: N-acetylcysteine
NFS: numération formule sanguine
NER: nucleotide excision repair
NFκB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NHEJ: non-homologous end joining
NHL: lymphomes B non-Hodgkiniens
NIX: Bnip3-like protein X
NK: natural killer
NO: nitric oxide
OPN: ostéopontine
PI3-K: phosphatidyl inositol-3-phosphate kinase
PIKKs: phosphoinositide 3-kinase related kinases
PON: paraoxonase
PYK-2: Protein tyrosine kinase 2
RAO: ratio d'amplification de l'oxygène
RI: rayonnements ionisants
RII: radio-immuno-imagerie
RIT: radioimmunothérapie

RIV : radiothérapie interne vectorisée
RNS: reactive nitrogen species = espèces réactives nitrées
ROS: reactive oxygen species = espèces réactives de l'oxygène
RPA: replication protein A
SAPK: stress-activated protein kinase
scFv: single chain variable fragment
Ser: sérine
SFK: Src family of protein tyrosine kinases
SM: sphingomyéline
SOD: superoxyde dismutase
SPECT: tomographie d'émission monophotonique
SSB: single strand break = cassure simple brin de l'ADN
STAT3: signal transducer and activator of transcription 3
TEP: tomographie d'émission de positon
TGF- β : transforming growth factor- β
TNF: facteur de nécrose tumorale
TEL: transfert linéique d'énergie
VEGF: Vascular endothelial growth factor
53BP1: p53 binding protein 1

Liste des figures

Figure 1: structure de l'ovaire adulte.....	18
Figure 2 : dissémination du cancer de l'ovaire	25
Figure 3: principe de la radio-immunothérapie	30
Figure 4 : structure d'une immunoglobuline d'isotype gamma (IgG) et de ses divers fragments.....	32
Figure 5 : différentes générations d'anticorps thérapeutiques : anticorps murins, chimériques, humanisés et humains	34
Figure 6 : mécanismes d'action des AcM thérapeutiques	35
Figure 7 : schéma illustrant la formation des électrons Auger	36
Figure 8 : schéma représentant le parcours dans la matière des radionucléides émetteurs de particules β , α et des électrons Auger	37
Figure 9 : parcours et densité d'ionisations des rayonnements de faible et fort TEL dans la matière.....	40
Figure 10 : parcours dans les tissus de particules α en fonction du TEL.....	41
Figure 11 : transfert linéique des électrons Auger en fonction de leur énergie.....	42
Figure 12 : courbe de survie typique observée lors d'une irradiation à faible ou fort TEL	43
Figure 13 : ratio d'amplification de l'oxygène.....	44
Figure 14 : schéma de désintégration de la production du ^{212}Bi et du ^{212}Pb	51
Figure 15 : schéma de désintégration de la production de l' ^{225}Ac et du ^{213}Bi	52
Figure 16 : illustration d'un radiomarquage métallique par voie "directe" (A) et "indirecte" (B)	54
Figure 17 : principaux amino acides ciblés pour la bioconjugaison.....	54
Figure 18 : la réaction entre une fonction isothiocyanate d'un agent chélateur et une amine primaire d'une protéine conduisant à la formation d'une liaison thiourée.....	55
Figure 19 : structure sélectionnée de DOTA et de ses analogues en RIT	56
Figure 20 : structure sélectionnée de DTPA et de ses analogues en RIT	56
Figure 21 : représentation de la variation de l'énergie spécifique z en fonction de la masse	65
Figure 22 : chronologie des événements induits par les rayonnements ionisants dans l'organisme humain.....	67
Figure 23 : effet direct et indirect des rayonnements ionisants sur l'ADN.....	68
Figure 24 : les différentes étapes de la radiolyse de l'eau.....	69
Figure 25 : schéma de la balance anti-oxydants/pro-oxydants représentant un stress oxydant.....	72
Figure 26 : principales classes de lésions produites au niveau de l'ADN par les rayonnements ionisants.....	73
Figure 27 : système de signalisation des dommages de l'ADN suite à une irradiation	77
Figure 28 : mécanismes de réparation des dommages de l'ADN.....	80
Figure 29 : les différentes voies de réparation des dommages de l'ADN	82
Figure 30 : aberrations chromosomiques produites par les rayonnements ionisants.....	84
Figure 31: aspects clés de la réponse bystander radio-induite.....	87
Figure 32 : voies clés affectant les signaux bystander	92
Figure 33 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de conjugaison d'un anticorps à un agent bifonctionnel chélatant.....	104

Figure 34 : protocole de transfert de milieu dans le cadre d'une RIT alpha au ^{213}Bi ...	108
Figure 35 : mesure de l'activité incorporée dans les cellules dans le cadre d'une RIT alpha au ^{213}Bi	109
Figure 36 : représentation de la localisation de l'anticorps radiomarqué sur la cellule ciblée.....	110
Figure 37 : schéma de désintégration radioactif du ^{212}Pb et de ses descendants.....	118
Figure 38 : courbe de calibration du DAR.....	118
Figure 39 : courbes de l'activité spécifique obtenues à partir des images DAR des tumeurs traitées avec les trois ^{212}Pb -AcM.....	119
Figure 40 : facteur S du ^{212}Pb calculés à partir de sphère d'eau.....	121
Figure 41 : modèles d'extrapolation des doses absorbées par les tumeurs traitées en RIT du ^{212}Pb à partir des images de DAR.....	122
Figure 42 : analyseur de biochimie Reflo Vet utilisé.....	124
Figure 43 : schéma illustrant le procédé de la technique de RIT flash.....	125
Figure 44 : représentation schématique d'un nodule de carcinose péritonéale.....	126
Figure 45 : analyseur d'hématologie Scil Vet [®] abc utilisé dans le cadre de l'étude de la NFS.....	129
Figure 46 : survie exprimée en fonction de l'activité volumique après (A) RIT au ^{212}Pb sur les cellules A-431 _{CEA-Luc} et (B) RIT au ^{213}Bi sur les cellules SK-OV-3 _{AMHR11}	132
Figure 47 : survie exprimée en fonction de la concentration d'anticorps non radiomarqués (A) Traitement des cellules A-431-CEA-Luc et (B) Traitement des cellules SK-OV-3 _{AMHR11}	133
Figure 48 : contribution des effets ciblés et non ciblés de la RIT alpha sur la survie des cellules.....	133
Figure 49 : survie clonogénique des cellules HCT 116 p53 ^{+/+} (A) et HCT 116 p53 ^{-/-} traitées avec en RIT à l' ^{125}I	134
Figure 50 : contribution des effets ciblés et non ciblés dans le cadre d'une RIT alpha ou Auger.....	135
Figure 51 : numération cellulaire des deux lignées utilisées.....	136
Figure 52 : taux d'expression du CEA (vert) et de HER2 à la surface des cellules A-431 _{CEA-Luc}	137
Figure 53 : Activité incorporée par cellule (Bq/cellule) en RIT alpha.....	138
Figure 54 : marquage des foci γ -H2AX (A – B) et 53BP1 (C – D) sur les cellules SK-OV-3 _{AMHR11} traitées par RIT au ^{213}Bi -16F12.....	140
Figure 55 : nombre moyen de foci γ -H2AX (A) et 53BP1 (B) comptés après RIT au ^{213}Bi des cellules SK-OV-3 _{AMHR11}	141
Figure 56 : schéma montrant les différentes tailles de foci γ -H2AX (A) et 53BP1 (B) observés dans les cellules donneuses SK-OV-3 _{AMHR11} après RIT au ^{213}Bi	141
Figure 57 : distribution des foci γ -H2AX et 53BP1 selon leur taille dans les cellules SK-OV-3 _{AMHR11} traitées par RIT au ^{213}Bi	142
Figure 58 : nombre moyen de foci 53BP1 comptés dans les cellules A-431 _{CEA-Luc} après la RIT au ^{212}Pb	143
Figure 59 : formation des foci γ -H2AX dans les cellules HCT 116 après RIT à l' ^{125}I	143
Figure 60 : micronoyaux observés sur les cellules A-431 _{CEA-Luc} traitées en RIT au ^{212}Pb	144
Figure 61 : nombre de micronoyaux par cellules binucléés observés sur les cellules A-431 _{CEA-Luc} donneuses et receveuses après traitement de RIT avec les ^{212}Pb -AcM.....	144

Figure 62 : nombre de micronoyaux par cellules binucléées	145
Figure 63 : mesure du stress oxydatif dans les cellules HCT 116 p53^{+/+} après RIT à l'¹²⁵I.	146
Figure 64 : mesure du stress oxydatif dans les cellules SK-OV-3_{AMHR11} après RIT au ²¹³Bi.	147
Figure 65 : mesure de l'apoptose sur les cellules receveuses traitées en présence d'inhibiteurs de ROS.	147
Figure 66 : mesure de la formation des radeaux lipidiques via la formation de céramides induits par l'activation de l'A-SMase sur les cellules HCT 116 p53^{+/+} traitées avec les ¹²⁵I-AcM	148
Figure 67 : mesure de l'activité de la sphingomyélinase acide et de la sphingosine-1-phosphate dans les cellules donneuses HCT 116 p53^{+/+}	149
Figure 68 : rôle des radeaux lipidiques dans les effets non ciblés	150
Figure 69 : mesure de l'activité de l'A-SMase dans les cellules SK-OV-3_{AMHR11} traitées en RIT au ²¹³Bi.	150
Figure 70 : mesure de la formation du céramide membranaire dans les cellules SK-OV-3_{AMHR11} traitées en RIT au ²¹³Bi.	151
Figure 71 : les MAPK sont impliquées dans les effets bystander radio-induits dans les cellules SK-OV-3_{AMHR11} traitées en RIT ²¹³Bi.	152
Figure 72 : activation des protéines MAPKs dans les cellules AN3CA traitées en RIT du ²¹³Bi.	152
Figure 73 : La protéine AKT est activée dans les cellules SK-OV-3_{AMHR11} après traitement au ²¹³Bi.	153
Figure 74 : voies de signalisation activées dans les cellules donneuses SK-OV-3_{AMHR11} traitées en RIT au ²¹³Bi.	154
Figure 75 : voies de signalisation activées dans les cellules receveuses SK-OV-3_{AMHR11} traitées en RIT au ²¹³Bi.	155
Figure 76 : voies de signalisation activées dans les cellules donneuses HCT 116 p53^{+/+} traitées en RIT ¹²⁵I.	156
Figure 77 : Inhibition des voies MAPK dans les cellules HCT 116 p53^{+/+} traitées en RIT Auger	157
Figure 78 : Activation de la protéine NF-κB dans les cellules traitées en RIT au ²¹³Bi.	158
Figure 79 : mesure des protéines de stress activées dans les cellules SK-OV-3_{AMHR11} traitées en RIT du ²¹³Bi-16F12.	159
Figure 80 : analyse des cytokines contenues dans le CM des cellules SK-OV-3_{AMHR11} traitées au ²¹³Bi-16F12.	160
Figure 81 : mesure de l'expression du récepteur de la lipocalin 2 (LCN2R) dans les cellules SK-OV-3_{AMHR11}	161
Figure 82 : mesure de la survie (A) et de la biodistribution (B) des cellules A-431_{CEA-Luc} traitées avec les ²¹²Pb-AcM [397].	162
Figure 83 : images autoradiographiques des différentes tumeurs traitées avec les anticorps radiomarqués au ²¹²Pb.	163
Figure 84 : distributions de dose absorbée obtenue pour chacune des tumeurs traitées au ²¹²Pb.	165
Figure 85 : histogrammes dose volume des tumeurs traitées avec le ²¹²Pb-trastuzumab (rouge), ²¹²Pb-35A7 (bleu) et ²¹²Pb-PX (vert).	166
Figure 86 : courbe de croissance tumorale des tumeurs traitées avec les ²¹²Pb-AcM.	167

Figure 87 : corrélation du dépôt de dose avec la formation des foci 53BP1 dans les tumeurs traitées au ^{212}Pb.	168
Figure 88 : nombre moyen de foci 53BP1 en fonction de la distribution de la radioactivité dans les tumeurs traitées avec les ^{212}Pb-AcM.	168
Figure 89 : mesure de la distribution de la radioactivité et de l'induction des foci 53BP1 dans les tumeurs traitées avec les ^{125}I-AcM [403].	170
Figure 90 : corrélation des effets biologiques observés avec la distribution de la radioactivité dans les tumeurs traitées au ^{212}Pb.	171
Figure 91 : lésions biologiques observées dans les tumeurs traitées avec les anticorps couplés au ^{212}Pb.	172
Figure 92 : toxicité hépatique et rénale (1^{er} mois) des souris traitées en RIT au ^{212}Pb. 174	
Figure 93 : toxicité tardive (sur 8 mois) des souris traitées en RIT au ^{212}Pb.	175
Figure 94 : Biodistribution du ^{213}Bi-16F12 après RIT flash ou RIT IP classique.	176
Figure 95 : Activité incorporée par la tumeur et les organes en lors la RIT au ^{213}Bi en fonction du temps.	177
Figure 96 : nodules tumoraux observés chez les souris avant le début du traitement au ^{213}Bi-16F12.	178
Figure 97 : courbe de croissance des souris traitées en RIT flash ou RIT IP classique du ^{213}Bi.	179
Figure 98 : courbe de tendance de la croissance des souris traitées en RIT flash ou RIT IP classique du ^{213}Bi.	179
Figure 99 : étude de la toxicité en RIT au ^{213}Bi.	180

Liste des tableaux

Tableau 1 : classification FIGO et AJCC/TNM de l'extension des tumeurs de l'ovaire .	20
Tableau 2: expression du récepteur AMHRII dans les tissus gynécologiques malins et bénins.....	28
Tableau 3 : essais cliniques utilisant les émetteurs de particules α	46
Tableau 4 : propriétés physiques des émetteurs d'électrons Auger	48
Tableau 5 : les particules α utilisées en RIT	50
Tableau 6 : Nom et unité de chaque symbole utilisé dans le formalisme du MIRD et de la CIPR.....	60
Tableau 7 : Bilan des différents radicaux libres centrés sur l'oxygène.....	70
Tableau 8 : Les dommages de l'ADN radioinduits et leurs spécifications physiques et biologiques.....	74
Tableau 9 : études in vivo des effets bystander	94
Tableau 10 : Facteur S utilisé dans le calcul de la dosimétrie cellulaire après une RIT au ^{213}Bi.....	111
Tableau 11 : probabilité d'émission des rayonnements (particules/Bq.s) du ^{212}Pb et de ses descendants.	120
Tableau 12 : valeurs des activités cumulées (en Bq.s/cellule) obtenues pour chacun des différents anticorps utilisés lors de la RIT au ^{212}Pb ou au ^{213}Bi.	139
Tableau 13 : mesures de la taille des foci $\gamma\text{-H2AX} / 53\text{BP1}$ dans les cellules SK-OV-3_{AMHRII} traitées en RIT au ^{213}Bi.....	142
Tableau 14 : ratio des cytokines observées dans les cellules traitées et non traitées.....	161
Tableau 15 : Doses tumorales moyennes absorbées des trois anticorps, obtenue en utilisant des facteurs S tumoraux spécifiques (dosimétrie spécifique de la tumeur) ; et en supposant une absorption locale et complète de l'énergie.	164
Tableau 16 : Les doses moyennes absorbées (Gy/Bq.s et Gy) obtenue pour chacune des tumeurs sélectionnées pour la dosimétrie voxelisée.	165
Tableau 17 : Ratio tumeur sur sang d'incorporation de l'activité mesurée dans les souris traitées en RIT flash et en RIT IP classique.	177

Table des matières

REMERCIEMENTS	1
Liste des abréviations	3
Liste des figures	6
Liste des tableaux	10
INTRODUCTION GENERALE	14
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	17
CHAPITRE 1 : LE CANCER DE L'OVAIRE	18
I. Généralité sur le cancer	18
A. Rappel de l'anatomie de l'ovaire.....	18
B. Classification histologique des tumeurs ovariennes.....	19
C. Causes du cancer de l'ovaire	21
II. Traitements du cancer de l'ovaire	22
A. La chirurgie	22
B. La chimiothérapie	22
C. Surveillance	23
D. Autre approche de traitement : L'immunothérapie	23
III. Extension de la tumeur ovarienne : la carcinose péritonéale	24
IV. Les tumeurs ovariennes et expression du récepteur de l'hormone anti-müllérienne	26
A. L'hormone anti – Müllérienne et ses récepteurs : structure et fonction	26
B. Rôle physiologique de l'hormone anti-müllérienne	27
C. L'axe AMH en cancérologie	28
CHAPITRE 2 : LA RADIOIMMUNOTHERAPIE	30
I. Généralités sur la radioimmunothérapie.....	30
A. Indications de la RIT	31
B. Paramètres clés de la RIT	32
1. Les anticorps monoclonaux	32
2. Le radionucléide	35
3. La tumeur	38
C. Limitations et optimisations possibles	39
II. Radioimmunothérapie des particules alpha et Auger	40
A. Radiobiologie des particules de fort transfert linéique	40
1. Notion de transfert linéique d'énergie (TEL)	40
2. Courbe de survie cellulaire : modèle linéaire quadratique	43
3. Effet de l'oxygène	43
4. Débit de dose.....	44

5. Notion d'efficacité biologique relative (EBR)	44
B. Indications de la RIT alpha et Auger	45
C. Les différents émetteurs de particules alpha et d'électrons Auger	47
1. Les radionucléides émetteurs d'électrons Auger	47
2. Les radionucléides émetteurs de particules alpha	49
3. Chimie de couplage des anticorps et les agents bifonctionnels chélatants (ABC)	54
III. Radioimmunothérapie et cancer de l'ovaire	57
A. Etudes précliniques.....	57
B. Etudes cliniques.....	57
CHAPITRE 3 : LA DOSIMETRIE EN RADIOTHERAPIE INTERNE VECTORISEE	59
I. Le Formalisme du MIRD	59
II. Dosimétrie multi-échelles	62
A. Dosimétrie organe	62
B. Dosimétrie multicellulaire et cellulaire	63
C. Dosimétrie voxélisée	63
III. Dosimétrie des particules de fort TEL	64
A. Techniques de calcul en microdosimétrie	65
B. Critères d'adoption de la microdosimétrie	66
CHAPITRE 4 : LES EFFETS CIBLES DES RAYONNEMENTS IONISANTS	67
I. Chronologie des événements radioinduits	67
A. La phase physique	68
B. La phase chimique	68
1. Les effets directs des RI	68
2. Les effets indirects des RI	69
3. Le stress oxydatif	69
C. La phase biologique	72
1. Les dommages de l'ADN radio-induits	72
2. La membrane cellulaire cible potentielle des RI	75
II. Réponse cellulaire aux rayonnements ionisants.....	76
A. La voie de signalisation ATM-Chk2	77
B. La voie de signalisation ATR-Chk1	78
C. Les principaux modes de réparation de l'ADN	79
1. Les voies de réparations des cassures doubles brins de l'ADN	80
2. La réparation des mésappariements	83
3. Les aberrations chromosomiques	83
III. La mort radiobiologique	84

CHAPITRE 5 : EFFETS NON CIBLES DES RAYONNEMENTS IONISANTS : LES EFFETS BYSTANDER	87
I. Les mécanismes de transmission des effets bystander	88
A. Communication cellule à cellule par jonction intercellulaire (GJIC)	88
B. Sécrétion de facteurs solubles	89
II. Nature des molécules de signalisation et voies impliquées dans la réponse bystander	90
A. Les signaux intercellulaires	90
1. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces nitrées de l'oxygène (RNS)	90
2. Les cytokines	91
3. Signalisation du calcium	92
B. Les signaux intracellulaires	93
1. Les Mitogen-activated protein kinase (MAPK)	93
2. Les radeaux lipidiques	93
3. Les points de contrôle des dommages ADN	94
III. Les effets bystander <i>in vivo</i>	94
IV. Relation entre les effets bystander et les autres effets non ciblés	95
V. Conséquences des effets bystander pour la thérapie	96
OBJECTIF DE LA THESE	98
MATERIELS ET METHODES	100
Matériels	101
I. Lignées cellulaires	101
II. Les anticorps monoclonaux	102
III. Le radiopharmaceutique	103
Méthodologie	107
I. Plan d'expérimentation <i>in vitro</i>	107
A. Mesure de la survie cellulaire	107
B. Mesure des lésions de l'ADN	111
C. Etude des mécanismes impliqués dans les effets bystander radio-induits	113
II. Plan d'expérimentation <i>in vivo</i>	115
A. Radioimmunothérapie <i>in vivo</i> au ²¹² Pb	115
B. Radioimmunothérapie flash au ²¹³ Bi ou BIP-RIT versus RIT IP classique	125
RESULTATS	130
DISCUSSION	181
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	192
BIBLIOGRAPHIE	194
ANNEXES	224

Introduction générale

Les cancers de la sphère gynécologique par leur fréquence et mortalité élevée représentent un important problème de santé publique en France. Le cancer de l'ovaire par exemple est la principale cause de décès par cancer gynécologique et la cinquième cause de décès par cancer chez les femmes et est souvent diagnostiqué à un stade avancé. Malgré les progrès de l'exérèse chirurgicale et la chimiothérapie, le cancer de l'ovaire continue d'être difficile à traiter et une majorité de femmes finissent par succomber à la maladie.

La découverte, il y a 30 ans de la technologie d'hybridation lymphocytaire par Köhler et Milstein [1] permettant la production et la sélection d'anticorps monoclonaux (AcM), a ravivé l'hypothèse d'Ehrlich selon laquelle il était possible d'utiliser une « balle magique » (« *magic bullet* ») pour cibler spécifiquement des cellules cancéreuses. De par leur nature monoclonale, ces anticorps sont très spécifiques d'un antigène. L'intérêt porté à ces anticorps pour la thérapie du cancer réside dans le fait que les cellules tumorales, au cours de l'acquisition de leur phénotype malin, expriment à leur surface des protéines qui sont inexistantes ou en quantité beaucoup plus faible à la surface des cellules normales (surexpression). Développer des anticorps monoclonaux spécifiquement dirigés contre ces antigènes de surface, permet donc de mieux les cibler et d'être ainsi plus efficace dans le traitement des tumeurs cancéreuses.

Afin d'augmenter l'efficacité des anticorps monoclonaux, ces derniers peuvent être marqués avec un isotope radioactif permettant d'associer un mécanisme d'action biologique lié aux propriétés mêmes de l'anticorps et une action radiobiologique liée aux propriétés des rayonnements ionisants : c'est la radioimmunothérapie (RIT). L'efficacité de la RIT a été démontrée en hématologie notamment pour le traitement des lymphomes non hodgkiniens aboutissant ainsi à la mise sur le marché du radiopharmaceutique Zevalin® pour traiter cette pathologie. Cependant, ce succès est pour le moment limité au traitement des lymphomes en raison notamment de la radiosensibilité majeure de ces tumeurs et de leur bonne accessibilité par les AcM. La RIT des tumeurs solides s'est avérée plus difficile du fait que ces tumeurs présentent des problèmes de vascularisation et de perfusion lorsque leur taille est supérieure au centimètre limitant l'accès de l'anticorps radiomarqué. Par conséquent la dose d'irradiation délivrée est la plupart du temps insuffisante pour éradiquer la tumeur. Il est aujourd'hui admis que la RIT des tumeurs solides ne doit s'adresser qu'à des tumeurs de petite taille (1-2 mm de diamètre) telles que les micrométastases ou les nodules présents dans la maladie résiduelle. Les micrométastases, constituées de cellules tumorales isolées issues de la tumeur primitive et disséminées dans différents organes, sont à l'origine de nombreuses récurrences. Adapter le traitement de RIT à ces cibles microscopiques, en particulier en recourant à des émetteurs de haut Transfert d'Énergie Linéique (TEL) de type particule alpha ou, électrons Auger semble donc nécessaire.

En 1926, Claudius Regaud et A. Lacassagne avaient prédit que « l'agent idéal du traitement du cancer serait constitué d'éléments lourds, capables d'émettre des rayonnements d'ordre moléculaire, qui seraient administrés dans l'organisme et se fixeraient dans le protoplasme des cellules que l'on cherche à détruire » [2]. Cette définition caractérise parfaitement la RIT alpha qui combine un radionucléide émetteur alpha avec un AcM. La particularité des émetteurs de fort TEL comme les particules alpha est la forte cytotoxicité produite sur un très faible parcours ce qui accroît fortement l'efficacité des traitements, mais

réduit aussi l'irradiation de type « feu croisé » (non spécifique) observé avec les émetteurs de particules bêta. L'énergie générée par les rayonnements ionisants peut entraîner des modifications de la matière vivante, au niveau cellulaire où ces rayonnements induisent des lésions. Ces observations qualifiées *d'effets ciblés* des rayonnements ionisants constituent la base même du dogme de la radiobiologie. Aujourd'hui ce paradigme est contesté du fait de la manifestation d'effets des rayonnements ionisants en dehors du champ d'irradiation. Ces effets dits « *non ciblés* » des rayonnements ionisants sont généralement qualifiés *d'effets bystander* et s'observent sur des cellules qui n'ont pas été irradiées, mais qui se trouvent à proximité des cellules irradiées. Les effets non ciblés des rayonnements ionisants peuvent être produits par l'intermédiaire de facteurs sécrétés dans le microenvironnement par les cellules irradiées, ou par les jonctions communicantes qui s'établissent entre deux cellules physiquement en contact. Dépendamment de la qualité du rayonnement utilisé (débit de dose ; faible ou fort TEL), la contribution de ces effets non ciblés en thérapie peut être plus ou moins prépondérante.

L'objectif de ce projet est d'évaluer dans le cadre de la RIT de modèles de carcinose péritonéale, la contribution des effets ciblés et non ciblés des rayonnements ionisants de haut TEL.

Introduction bibliographique

CHAPITRE 1

LE CANCER DE L'OVAIRE

I. Généralités sur le cancer de l'ovaire

Les cancers ovariens appartiennent aux dix types de cancers le plus fréquents. Selon l'Institut Curie, 230 000 femmes sont diagnostiquées porteuses d'un cancer de l'ovaire tous les ans dans le monde. En raison d'un diagnostic souvent tardif, jusqu'à 70 % d'entre elles décèdent dans les cinq ans après le dépistage ; ce qui fait des tumeurs ovariennes la cinquième cause de mortalité liée à un cancer chez la femme [3]. La survie relative à 5 ans tous stades confondus n'est que de 35% en France.

A. Rappel de l'anatomie de l'ovaire

Les ovaires normaux sont des organes ovoïdes et aplatis qui mesurent, pendant la période d'activité génitale de la femme, 3 cm de long, 2 cm de large et 1 cm d'épaisseur et pèsent entre 2 et 4 g. Après la ménopause, ils s'atrophient. Ils se situent dans la cavité péritonéale pelvienne et ont pour fonction de sécréter des hormones stéroïdiennes (fonction endocrine) et donner naissance à des ovocytes (fonction exocrine). L'ovaire normal est formé de l'épithélium, de la zone corticale et de la zone médullaire (Figure 1).

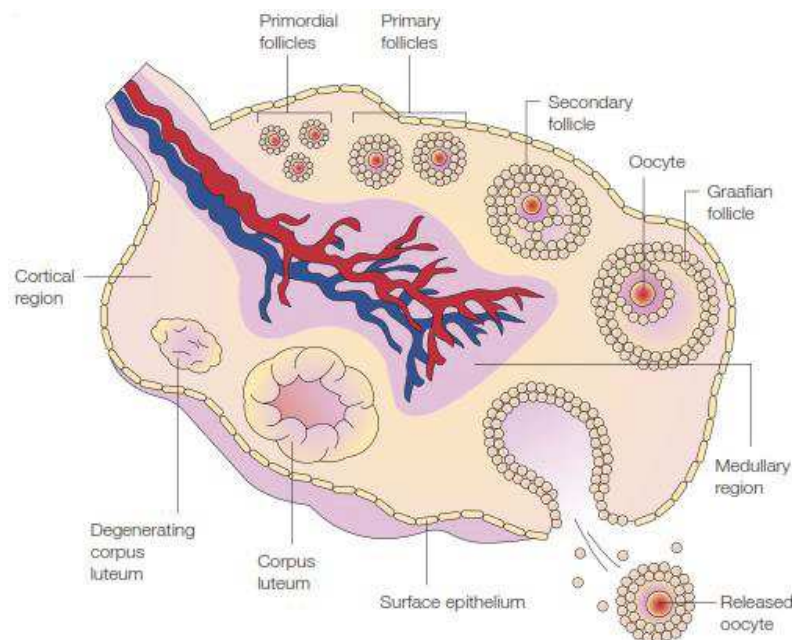


Figure 1: structure de l'ovaire adulte [4]. La surface de l'ovaire est recouverte d'une seule couche de cellules épithéliales : l'épithélium de l'ovaire. L'ovaire est formé d'une grande surface corticale et une petite région médullaire qui sont composées de cellules de type fibroblastes et de cellules musculaires lisses. La région médullaire contient les plus grands vaisseaux sanguins (indiqués en rouge et bleu). La région corticale contient les follicules portant chacun un ovocyte. Les follicules primaires résultent de la croissance des follicules primordiaux, puis se développent en follicules secondaires et matures dans les follicules de De Graaf. Lors de l'ovulation, la surface de l'ovaire est rompue lorsque l'ovocyte est libéré. Après l'ovulation, les restes du follicule sont transformés dans le corps jaune, une structure glandulaire qui sécrète les hormones sexuelles féminines.

L'épithélium de l'ovaire également appelé mésothélium ovarien est une monocouche cellulaire enveloppant l'ovaire, séparée du stroma ovarien par une basale et une structure dense: la tunica albuginea, qui joue un rôle de barrière pour la diffusion d'agents actifs. On assigne à cet épithélium deux rôles principaux: le transport d'éléments entre la cavité péritonéale et l'ovaire, et la rupture, suivie de la réparation de la surface de l'ovaire lors de l'ovulation. Son fonctionnement varie selon la période du cycle, laissant supposer une hormonodépendance.

La zone corticale, épaisse, est située à la périphérie ; elle comporte des follicules ovariens contenant les ovocytes et le stroma ovarien. Quant à la zone médullaire, elle est située au centre de l'ovaire et est plutôt spongieuse et très vascularisée. Elle est composée du tissu conjonctif lâche, des nerfs et des vaisseaux sanguins.

B. Classification histologique des tumeurs ovariennes

Selon leur histologie, les cancers de l'ovaire peuvent être classés en trois catégories : les tumeurs épithéliales, les tumeurs des cordons sexuels/stroma et les tumeurs germinales [5].

1. Tumeurs des cordons sexuels/stroma

Les tumeurs des cordons sexuels sont des tumeurs qui dérivent des cellules folliculaires de la granulosa, de la thèque, et d'autres cellules stromales (fibromes). Dans ce groupe, les tumeurs des cellules de la granulosa représentent la majorité des tumeurs malignes des cordons sexuels et du stroma. Les tumeurs des cordons sexuels correspondent à 8 % de toutes les tumeurs ovariennes et environ 7 % des tumeurs malignes de l'ovaire [5].

2. Tumeurs germinales

Les tumeurs germinales de l'ovaire représentent 3 à 7 % des cancers de l'ovaire. Ce sont des tumeurs à croissance rapide qui se développent à partir des cellules germinales primordiales issues de la gonade embryonnaire. Ces tumeurs sont peu fréquentes et bénignes chez la femme adulte, alors qu'elles représentent plus de la moitié des tumeurs ovariennes se développant chez les fillettes et les adolescentes [5]. Environ 95 % des tumeurs germinales sont représentées par des tératomes (dérivant des trois feuilletts embryonnaires) kystiques bénins. Les 5 % restants constituent les tumeurs germinales malignes.

3. Tumeurs épithéliales

Les tumeurs épithéliales représentent environ 65 % des tumeurs de l'ovaire et près de 90 % des tumeurs malignes ovariennes (adénocarcinomes) [5]. Deux théories ont été proposées pour expliquer le développement du cancer à partir de l'épithélium. La théorie de « *l'ovulation incessante* », développée par Fathalla *et al* [6], postule que la répétition des déchirures et des réparations de l'épithélium après chaque ovulation peut provoquer l'accumulation de mutations et le développement d'une tumeur. Cette théorie est la plus généralement admise. La seconde théorie dite « *des hormones gonadotropes* », développée par Cramer et Welch [7], suggère que

la première étape du processus de cancérisation est la formation de kystes d'inclusion par invagination de l'épithélium de surface ovarien au niveau du stroma. Ceci provoquerait une brèche au niveau du tissu de soutien séparant l'épithélium de surface du cortex ovarien et favoriserait ainsi le contact des cellules épithéliales avec les cellules sécrétant les hormones stéroïdiennes. La seconde étape serait donc représentée par la stimulation des cellules épithéliales par les facteurs de croissance (œstrogènes, liquide folliculaire, gonadotrophines etc.) entraînant une prolifération, une différenciation cellulaire et dans certains cas en convergence avec d'autres agents, une transformation maligne [8].

Les tumeurs épithéliales peuvent être classées selon plusieurs critères: la classe tumorale (potentiel évolutif), le type histopathologique, le grade histologique et le stade. Par exemple la stadification du cancer de l'ovaire est basée sur l'étendue ou l'extension de la maladie. Elle est déterminée par des biopsies prélevées lors de l'acte chirurgical, ainsi que par la présence ou non de cellules cancéreuses dans le liquide de lavage abdominal. La classification de l'extension du cancer de l'ovaire peut utiliser soit les stades FIGO (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique), soit le système AJCC (*American Joint Committee on Cancer*)/TNM.

Tableau 1 : classification FIGO et AJCC/TNM de l'extension des tumeurs de l'ovaire [5]

Stades FIGO	Classification AJCC/TNM	Extension
I	T1	Tumeur limitée aux ovaires
IA	T1a	Tumeur limitée à un seul ovaire avec capsule intacte
IB	T1b	Tumeurs des deux ovaires avec capsule intacte
IC	T1c	Rupture capsulaire ou tumeur à la surface d'un ovaire ou cellules malignes dans le liquide d'ascite ou de lavage péritonéal
II	T2	Tumeur ovarienne étendue au pelvis
IIA	T2a	Extension à l'utérus et/ou aux trompes
IIB	T2b	Extension aux autres organes pelviens
IIC	T2c	Extension pelvienne avec cellules malignes dans le liquide d'ascite ou de lavage péritonéal
III	T3 et/ou N1	Métastases péritonéales au-delà du pelvis et/ou adénopathies métastatiques régionales
IIIA	T3a	Métastases péritonéales microscopiques
IIIB	T3b	Métastases macroscopiques ≤ 2 cm
IIIC	T3c et/ou N1	Métastases macroscopiques > 2 cm et/ou adénopathies métastatiques régionales
IV	M1	Métastases à distances (autres que métastases péritonéales)

C. Causes du cancer de l'ovaire

Les événements biologiques qui mènent au cancer de l'ovaire restent mal connus. Les études scientifiques ont néanmoins permis de distinguer différents types de facteurs de risque du cancer de l'ovaire dont l'âge, les facteurs génétiques, hormonaux, environnementaux, pathologiques et inflammations.

1. L'âge

Pour la plupart des cancers, l'âge constitue le principal facteur de risque. Le risque de développer un cancer de l'ovaire augmente régulièrement avec l'âge. La fréquence maximale se situe entre 60 et 70 ans [9].

2. Facteurs génétiques

Il est admis aujourd'hui que 5 à 10 % de l'ensemble des cancers de l'ovaire ont une origine génétique avec une transmission autosomique dominante. Les femmes ayant des antécédents familiaux de cancer du sein et du côlon peuvent avoir un plus grand risque de développer le cancer de l'ovaire.

Les mutations dans les gènes BRCA1 et/ou BRCA2 sont responsables de 90 % des cancers de l'ovaire héréditaires. BRCA1 et BRCA2 sont des gènes suppresseurs de tumeurs. Ils contrôleraient la régulation du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Les femmes porteuses de la mutation BRCA1/2 ont 10 fois (35 – 60 % pour *BRCA1* et 12 – 25 % pour *BRCA2*) plus de risque de développer un cancer de l'ovaire que les femmes non-porteuses (1,6 %) [10]. Ceci est dû au fait que les cellules porteuses de ces mutations sont incapables de réparer les cassures doubles brins de l'ADN d'une façon fidèle et ont plutôt recours à la réparation par jonction des extrémités non homologues (NHEJ) menant ainsi à l'instabilité génomique et au cancer [11]. Les mutations de BRCA1 sont détectées dans 75 % des familles qui ont des antécédents familiaux de cancer de l'ovaire, tandis que le risque de cancer d'ovaire chez les femmes porteuses d'une anomalie de BRCA2 est d'environ 10 à 20 % et de cancer du sein de 35 % [12].

Enfin, le syndrome de Lynch ou HNPCC (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*) prédispose aux cancers colorectaux, endométriaux, ovariens et urinaires. Ce syndrome est associé à des mutations des gènes de réparation des mésappariements de l'ADN (*DNA mismatch repair genes*) [10].

3. Facteurs hormonaux

Les grossesses multiples, l'allaitement et la prise de contraceptifs oraux sont associés à une diminution du risque du cancer de l'ovaire puisqu'ils inhibent l'ovulation. Inversement, la ménarche précoce, la ménopause tardive, la nulliparité, l'infertilité et la prise d'hormones à la ménopause augmentent les risques de développement du cancer de l'ovaire [6]. Les niveaux élevés de la gonadotrophine stimulent l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH) augmentant ainsi la production d'œstrogène. L'œstrogène stimule la prolifération des cellules épithéliales de l'ovaire, pouvant mener ainsi au développement des tumeurs ovariennes [13].

II. Traitements du cancer de l'ovaire

Le traitement classique du cancer de l'ovaire est d'abord chirurgical, suivi le plus souvent d'une chimiothérapie puis d'une surveillance.

A. La chirurgie

La chirurgie occupe une place importante à toutes les étapes de la prise en charge des cancers de l'ovaire: pour le diagnostic, pour la détermination du stade, pour la thérapeutique et le suivi de la réponse au traitement. En général, la chirurgie s'accompagne d'un lavage péritonéal et d'un examen du liquide d'ascite. Elle est adaptée au stade de l'évolution de la tumeur. Dans le cas de cancers ovariens précoces (stade I-II), l'intervention chirurgicale comporte une annexectomie bilatérale (ablation des deux côtés des trompes de Fallope et des ovaires) avec hystérectomie totale (ablation de l'utérus et du col de l'utérus), une omentectomie (ablation d'une partie de péritoine) et une appendicectomie (ablation de l'appendice) systématique ainsi qu'une exploration complète de la cavité péritonéale et des chaînes ganglionnaires.

Chez la femme jeune sans enfant en présence d'une lésion unilatérale (de bon pronostic, stade IA), le traitement peut être conservateur (annexectomie unilatérale et exploration) pour préserver la fécondité. Dans les cas de cancers ovariens avancés (stade III-IV), la chirurgie a avant tout un rôle de réduction tumorale. En effet, moins le résidu tumoral est important, plus la survie est prolongée. L'exérèse doit donc être la plus complète possible. Dans les cas d'extension tumorale étendue, il est parfois nécessaire de réaliser des résections complémentaires: rectum, côlon, grêle, rate, vessie [9].

B. La chimiothérapie

Les médicaments actifs sur le carcinome ovarien sont généralement une combinaison d'agents de la catégorie des taxanes, tels que le paclitaxel ou le docetaxel, et d'agents de la catégorie des sels de platines comme le carboplatine ou le cisplatine. Les taxanes ont un effet stabilisateur sur les microtubules cellulaires. Cela empêche leur réorganisation et inhibe ainsi le déroulement de la mitose, ce qui conduit à la mort cellulaire. Les sels de platines empêchent les brins d'ADN de se séparer, ce qui prévient la réplication de l'ADN et donc la division cellulaire [9]. Ces médicaments sont injectés soit par voie intraveineuse, soit par voie intrapéritonéale.

La chimiothérapie est utilisée systématiquement dans les cancers de l'ovaire (à l'exception des stades IA et IB, grade 1 ou 2 qui sont de bon pronostic) selon différents protocoles : chimiothérapie préparatoire à la chirurgie, chimiothérapie adjuvante après exérèse chirurgicale incomplète ou complète et chimiothérapie palliative en situation d'échec.

C. Surveillance

La surveillance d'un cancer de l'ovaire traité a comme but principal la détection précoce d'une récurrence chez les femmes. Elle permet d'évaluer également l'efficacité des traitements utilisés en cas de maladie évolutive. La surveillance repose sur un examen clinique complet, les méthodes d'imagerie et le dosage des marqueurs tumoraux (dosage du CA-125). Ces méthodes permettent de mettre en évidence une éventuelle masse résiduelle. Bien que les taux de réponse à la chimiothérapie soient proches de 80 %, les trois quarts des patientes, initialement sensibles au traitement, rechutent et développent une chimiorésistance. Le seul traitement reste malgré tout, une reprise de la chimiothérapie [9].

D. Autre approche de traitement : L'immunothérapie

Le Cancer épithélial de l'ovaire, comme la plupart des cancers, est une tumeur immunogène, c'est-à-dire qu'elle exprime ou surexprime des antigènes de tumeur. Ces antigènes de tumeur sont acquis par la cellule tumorale dans son processus de transformation néoplasique et sont capables de générer une réaction immunitaire antitumorale humorale, *via* des anticorps, ou cellulaire *via* des cellules cytotoxiques par exemple les lymphocytes T CD8⁺ [11, 12]. Le premier antigène de tumeur découvert dans ce type de cancer est la protéine HER2/neu, récepteur membranaire impliqué dans la prolifération cellulaire [16]. D'autres antigènes ont par la suite été identifiés comme le CA-125 également connu sous le nom de MUC1 [17], TAG-7 [18], ou encore les antigènes du groupe testis (NY-ESO1, MAGE, BAGE etc.) [19]. Ces antigènes de tumeurs permettent à « l'hôte » de déclencher une réaction immunitaire dite adaptative, dirigée contre les cellules tumorales, reconnues comme des cellules du « non-soi ». Cette réaction est médiée par des cellules immunitaires cytotoxiques qui vont infiltrer la tumeur pour exercer leur action antitumorale. Cette infiltration lymphocytaire tumorale par des TIL (*Tumor Infiltrating Lymphocytes*) va conditionner le pronostic de la patiente. Ainsi, Zhang *et al* ont ainsi pu démontrer que la présence de TIL était un facteur pronostic majeur : toutes patientes confondues (réponse complète, incomplète ou nulle à la chirurgie et la chimiothérapie) l'absence de TIL implique une survie à 5 ans de moins de 5 % [20].

Le but de l'immunothérapie du cancer de l'ovaire est donc de cibler de façon spécifique l'un des nombreux antigènes exprimés par les cellules tumorales de l'ovaire afin de réactiver l'immunité de l'organisme et de lutter contre la tumeur. Pour ce faire, le traitement se focalise sur l'injection intraveineuse (IV) d'AcM ; de transfert adoptif de lymphocytes cytotoxiques (immunothérapie passive) ou encore des vaccinations (immunothérapie active) [20, 21]. L'immunothérapie dite passive consiste à injecter aux patientes soit des anticorps, soit des cellules immunitaires cytotoxiques dirigées contre les cellules tumorales. Il existe un certain nombre d'essais cliniques qui ont utilisé différents AcM dirigés contre les différents antigènes de tumeurs des cancers épithéliaux de l'ovaire par exemple l'*oregovomab* dirigé contre le CA-125 [22]. Ces immunothérapies ont montré jusqu'à ce jour une bonne tolérance, mais des bénéfices cliniques assez mitigés, malgré une réponse immunitaire objectivée [20, 21]. L'immunothérapie adoptive utilise des cellules immunitaires de la patiente, modifiées *ex vivo* pour être dirigées contre les antigènes de tumeur, puis réinjectées aux patientes [25]. Des essais

cliniques de phase I d'immunothérapie adoptive ont été réalisés avec obtention de réponses cliniques [24, 25]. Cependant, l'infrastructure lourde nécessaire à la mise en place d'une immunothérapie adoptive peut être un frein à sa diffusion.

L'immunothérapie active suppose une activation des ressources immunitaires du patient pour permettre la lyse tumorale. Elle regroupe plusieurs stratégies, dont la vaccination, qui peut être peptidique ou cellulaire. La vaccination peptidique a été évaluée cliniquement. Elle consiste à injecter un peptide correspondant à un antigène de tumeur par exemple HER2-neu [28], p53 [29] ou NY-ESO-1 [28, 29] ou correspondant à une protéine chimérique, résultat de la fusion de plusieurs antigènes de tumeur comme par exemple le peptide chimérique HER2-neu/MAGE/FR α [32]. Ce peptide doit déclencher une réponse immunitaire adaptative chez la patiente qui va cibler ce peptide et également les cellules tumorales puisque présentant les mêmes Ag peptidiques. La vaccination cellulaire consiste à injecter à la patiente une cellule présentatrice d'Ag (en général une cellule dendritique), modifiée pour présenter un Ag de tumeur [33]. Les essais cliniques basés sur les vaccinations ont montré une bonne tolérance clinique, la capacité à déclencher une réponse immunitaire, mais malheureusement de faibles bénéfices cliniques à ce jour. Des essais se poursuivent, associant plusieurs stratégies d'immunothérapie active et passive avec des réponses thérapeutiques objectives, mais toujours sur des effectifs très faibles de patientes [34].

III. Extension de la tumeur ovarienne : la carcinose péritonéale

Dans le cancer de l'ovaire, environ 70 – 75 % des patientes présentent déjà une extension abdomino-pelvienne au moment du diagnostic. La dissémination du cancer de l'ovaire peut se produire de trois manières : la dissémination par voie péritonéale, par vaisseaux lymphatiques et par veines vers d'autres organes (Figure 2)

- la dissémination par voie lymphatique peut toucher l'ensemble des ganglions locorégionaux ; ganglions lombo-aortiques, pelviens et inguinaux.
- la dissémination métastatique en dehors de la cavité abdominale est plus rare, elle peut toucher le poumon, la plèvre, le cerveau, le foie et le sein [7, 33, 34].
- la dissémination par voie péritonéale est la plus souvent rencontrée [4]. Lorsque la capsule de l'ovaire se rompt, les cellules tumorales peuvent se disperser dans la cavité péritonéale. Du fait de la situation intrapéritonéale des ovaires et de l'origine commune avec la séreuse péritonéale, les cellules malignes diffusent spontanément dans la cavité abdomino-pelvienne, se greffent sur le péritoine et peuvent aller envahir différents organes dans cette cavité (Cul-de-sac de Douglas, grand épiploon, gouttière pariéto-coliques, coupes diaphragmatiques et le tractus intestinal). Cette dissémination de la tumeur vers le péritoine est appelée carcinose péritonéale.

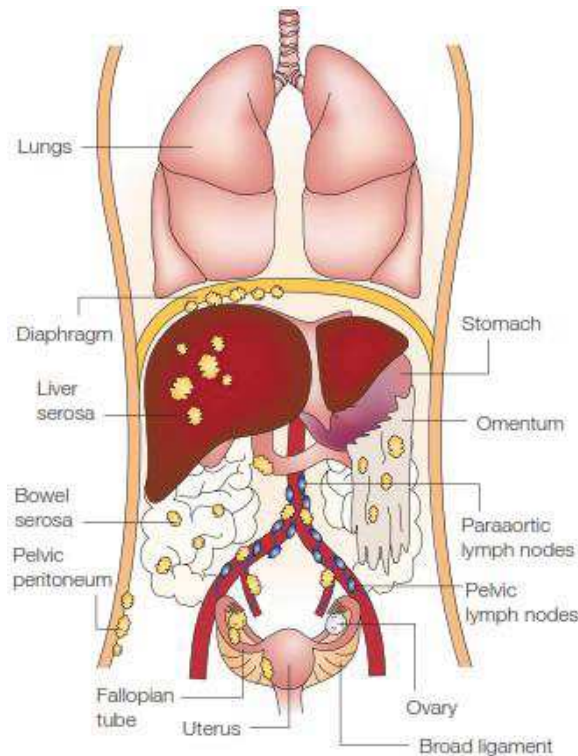


Figure 2 : dissémination du cancer de l’ovaire [4]. À l’étape précoce (étape IA / IB), la tumeur (représentée par les masses jaunes sur la figure) est limitée à un ou deux ovaires, la capsule ovarienne est intacte, et aucune tumeur n’est présente sur la surface de l’ovaire, dans l’ascite ou la cavité péritonéale. Une fois que la capsule est rompue, la tumeur se propage au-delà des limites des ovaires. Il s’en suit une invasion des tissus adjacents tels que l’utérus, les trompes de Fallope, le revêtement mésothélial de la cavité pelvienne (péritoine) et le ligament large. Une ascite est souvent associée à la dissémination intrapéritonéale. Les cellules tumorales peuvent également se propager à travers les vaisseaux lymphatiques qui drainent les ovaires aux ganglions lymphatiques pelviens et para-aortiques.

La carcinose péritonéale se définit comme l’extension métastatique d’un cancer primitif le plus souvent intra-abdominal, aux surfaces séreuses péritonéales. Les adénocarcinomes digestifs et ovariens en sont le plus souvent responsables, mais d’autres tumeurs primitives comme les cancers du sein et les sarcomes des tissus mous peuvent aussi être en cause [37]. La carcinose péritonéale représente l’un des trois modes de dissémination des cancers avec la diffusion hématogène et lymphatique. La survenue d’une carcinose péritonéale marque un tournant évolutif de la maladie en raison d’un pronostic fatal à court terme ; en effet, son évolution spontanée est habituellement de quelques mois [38, 39]. Les traitements adjuvants tels que la chimiothérapie systémique et la radiothérapie complémentaire sont décevants, de même que la chirurgie de réduction tumorale faite isolément [37, 40, 41].

Une nouvelle thérapie, la chimiothérapie associée à l’hyperthermie délivrée par voie intrapéritonéale (CHIP) initialement responsable d’un très fort taux de morbidité connaît depuis dix ans un regain d’intérêt et des travaux cliniques rapportent des résultats encourageants [42–44]. La CHIP peut être envisagée :

- à titre palliatif devant une carcinose péritonéale avérée et non accessible à une chirurgie de cytoréduction macroscopiquement complète, ou ;
- à visée curative en association à une chirurgie de cytoréduction macroscopiquement complète, ou ;

- à titre prophylactique pour prévenir le développement d'une carcinose après traitement chirurgical d'un cancer gastrique non métastatique dont le principal mode de diffusion se fait à partir de la séreuse péritonéale.

L'intérêt de la CHIP comparée à une simple chimiothérapie intrapéritonéale est l'adjonction de l'hyperthermie. En effet, cette hyperthermie permet d'augmenter de manière importante, la diffusion intratissulaire et intracellulaire des produits chimiothérapeutiques [45, 46]. La température idéale est 43°C puisque des lésions du grêle commencent à survenir à 44°C [47]. Inversement, chaque degré perdu divise par deux la potentialisation par la chaleur [48], ce qui amène à penser qu'aucun secteur de la cavité péritonéale ne doit descendre en dessous de 41°C si l'on veut effectuer une CHIP efficace. Cette intervention peut se faire soit abdomen ouvert ou fermé. Les principales molécules utilisées sont les sels de platine et les taxanes, qui peuvent être utilisés seuls ou en association. Les autres molécules pouvant être associées au cisplatine sont : la mitomycine C, la doxorubicine, l'interféron alpha ou l'adriamycine.

Actuellement, le traitement de la récurrence péritonéale du cancer de l'ovaire consiste à associer une chirurgie réductrice avec la CHIP. Cette association augmente la survie des patientes ; la CHIP est bien tolérée avec une mortalité relativement faible, mais une certaine morbidité se produit suite à des complications chirurgicales. Notons aussi que la CHIP est un traitement agressif, qui ne peut être proposé qu'à des patients encore en bon état général sans pathologie associée.

Pour permettre à un plus grand nombre de patientes d'être traitées, il est urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques capables de traiter cette récurrence. L'une d'elles peut être la radioimmunothérapie qui est une radiothérapie vectorisée utilisant comme vecteur un AcM couplé à un radionucléide et ciblant un récepteur spécifique exprimé à la surface des cellules tumorales.

IV. Les tumeurs ovariennes et expression du récepteur de l'hormone anti-müllérienne

A. L'hormone anti – Müllérienne et ses récepteurs : structure et fonction

L'hormone anti-müllérienne (AMH), également appelée substance inhibitrice müllérienne (MIS pour *Müllerian Inhibiting Substance*) est une glycoprotéine de 140 kDa composée de 535 acides aminés, et appartenant à la superfamille du *transforming growth factor-β* (TGF-β). L'AMH est formée de deux chaînes reliées par des ponts disulfures. Elle est synthétisée sous forme d'un précurseur qui nécessite un clivage protéique près de l'extrémité C-terminal pour acquérir une activité biologique. Seul le fragment C-terminal de 25 kDa est biologiquement actif. Le gène codant l'AMH est localisé sur le chromosome 19 [49].

Les ligands, membres de la famille du TGF-β, transduisent leur signal par l'intermédiaire de deux types de récepteurs. Le récepteur primaire, dit récepteur de type II (AMHRII ou MISIIR), est une sérine/thréonine kinase à un seul domaine transmembranaire qui est capable de lier son ligand mais ne peut, à elle seule transmettre le signal biologique. Pour ce faire, l'AMHRII doit recruter et activer une deuxième sérine/thréonine kinase, le récepteur

de type I (AMHRI ou MISIR), qui à son tour active une protéine effectrice cytoplasmique. Les données actuelles indiquent que ces récepteurs de type I font partie de la famille des Alk (Activin-like kinase) et peuvent en fait être Alk2, Alk3 et Alk6 [48], [50].

En effet, quelle que soit la cellule ciblée, l'AMH en se liant à son récepteur de type II induit la phosphorylation de l'AMHRI. Ainsi activé, AMHRI déclenche une cascade de signalisation provoquant l'apoptose ou l'arrêt de la prolifération de la cellule cible. Différentes voies de signalisation peuvent être impliquées telles que la voie intracellulaire Smad ou celle du complexe β -catenin/LEF-1 (Lymphoid Enhancer factor-1). D'autres études suggèrent que l'AMH limite la croissance cellulaire par des voies de signalisation différentes impliquant l'inhibiteur de kinase dépendant de cyclines (CDKI) ou le facteur nucléaire - κ B (NF κ B) [51].

Seul le récepteur de type II a été cloné chez le rat, le lapin, la souris et l'homme [52]. Il contient 11 exons, en particulier les exons 1 à 3 qui codent le domaine extracellulaire, composé de 127 acides aminés dans le récepteur humain, et l'exon 2 qui semble important dans la liaison à l'AMH. Classiquement, il s'exprime dans les tissus naturels cibles, soit dans le mésenchyme autour du canal de Müller, dans les cellules de Sertoli et de Leydig et dans les cellules de la granulosa.

B. Rôle physiologique de l'hormone anti-müllérienne

Chez l'homme, l'hormone anti-müllérienne est impliquée au stade embryonnaire dans la différenciation sexuelle. Ce processus programmé génétiquement, a lieu entre la 3^{ème} et la 12^{ème} semaine de l'embryon ; et porte successivement sur les gonades, les voies génitales internes puis les organes génitaux externes. La différenciation dans le sexe masculin interne dépend des hormones androgènes testiculaires (testostérone). Un défaut de synthèse d'androgènes aboutit à un défaut de masculinisation du fœtus. Deux phénomènes marquent la différenciation des voies génitales masculines : (i) le développement et la différenciation des canaux de Wolff et (ii) la régression des canaux de Müller. La testostérone produite par les cellules de Leydig dans les testicules fœtaux induit le déploiement des canaux de Wolf dès la 8^{ème} semaine. Les canaux de Müller eux, régressent chez le garçon entre la 8^{ème} et la 11^{ème} semaine sous l'action de l'hormone AMH, sécrétée dans les cordons séminifères par les cellules de Sertoli. L'AMH est sécrétée pendant toute la vie fœtale puis son taux diminue de manière progressive jusqu'à devenir très faible à la puberté [8].

Chez la femme, l'AMH est une hormone produite uniquement après la naissance (et jusqu'à la ménopause) et en faible quantité par les cellules granuleuses au début du développement des follicules ovariens immatures appelés follicules antraux. Dans l'ovaire, l'AMH régule le recrutement du follicule primordial et la sensibilité à l'hormone folliculo-stimulante (FSH) des follicules en croissance sur un mode inhibiteur. Une femme naît avec approximativement un million d'ovules et au cours de sa vie reproductive son nombre d'ovules diminuera par attrition et par ovulation. La diminution du nombre de ces follicules antraux provoque une chute du taux d'hormone anti-müllérienne dans le sérum sanguin. Ainsi, le dosage de l'AMH dans le sang est une méthode intéressante dans l'estimation du nombre résiduel d'ovules [61].

C. L'axe AMH en cancérologie

Des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que l'AMH ne joue pas seulement un rôle important dans le développement sexuel embryonnaire, mais provoque également une inhibition de la croissance des cellules exprimant des récepteurs à l'AMH. Behringer et al [55] ont montré chez les souris femelles transgéniques, surexprimant l'AMHRII, que l'AMH provoque un développement ovarien anormal en plus de la régression des canaux de Müller. Comme la plupart des cancers ovariens est issu de l'épithélium cœlomique dont l'origine embryonnaire est la même que celle des canaux de Müller, il est donc attendu que l'AMH soit capable d'inhiber la croissance des cancers de l'ovaire. Il a ainsi été démontré que le récepteur AMHRII est surexprimé à la surface des multiples lignées tumorales ovariennes malignes humaines : des tumeurs épithéliales, des tumeurs du mésenchyme et des cordons sexuels et aussi certaines tumeurs germinales [51]. Cette observation s'étend à la sphère génitale en raison de la surexpression de l'AMHRII dans de nombreuses lignées et biopsies tumorales utérines [55, 61] comme le montre le tableau 1

Tableau 2: expression du récepteur AMHRII dans les tissus gynécologiques malins et bénins [57]

Tissue	MISHR expression	p value
Ovarian cancer (all EOCs)	125/182 (69%)	0.008 ^{a, b}
Serous	22/29 (76%)	0.002 ^{a, b}
Clear cell	10/25 (40%)	0.14 ^{a, b}
Endometrioid	17/31 (55%)	0.011 ^{a, b}
Mucinous	3/3 (100%)	0.018 ^{a, b}
Benign ovarian epithelium	0/5 (0%)	–
Dysgerminoma	17/22 (77%)	<0.001 ^{c, d}
Benign ovarian stroma	3/24 (12.5%)	–
Endometrial cancer (all histologies)	82/109 (75%)	<0.001 ^{c, e}
Benign endometrium	39/139 (28%)	–
Proliferative	11/68 (17%)	<0.001 ^{c, f}
Secretory	16/47 (34%)	<0.001 ^{c, f}
Atrophic	12/24 (50%)	0.018 ^{c, f}
Uterine malignant mixed Müllerian tumor	30/51 (59%)	<0.001 ^{c, g}
Leiomyosarcoma	15/29 (52%)	0.004 ^{a, g}
Endometrial stromal sarcoma	4/18 (22%)	0.27 ^{a, g}
Benign myometrium	0/11 (0%)	–

Histologic subtype was available for 88 of the 182 EOCs.

^a Fisher's exact test.

^b Chi square.

^c Compared to benign ovarian epithelium.

^d Compared to benign ovarian stroma.

^e Compared to overall benign endometrium.

^f Compared to endometrial cancer.

^g Compared to benign myometrium.

Par ailleurs, deux lignées commerciales de cellules de cancer de l'endomètre, KL et AN3CA, apparaissent également exprimer le récepteur AMHRII et leur croissance est aussi inhibée par la présence de l'AMH [58]. Également les cellules cancéreuses du sein et de la prostate, ont été proposées comme cible potentielle de l'AMH, et l'effet inhibiteur de cette hormone sur ces cellules a été démontré *in vitro* [56] et *in vivo* [63, 64].

Les études comparatives entre les lignées bénignes, les lignées à la limite de la malignité et les lignées malignes, ont mis en évidence que l'expression du récepteur AMHRII est signe

de la gravité des tumeurs. L'ensemble de ces résultats fait de l'AMHRII un nouveau biomarqueur intéressant des cellules tumorales de la sphère génitale.

L'AMHRII est devenu le centre de deux axes de recherche portant sur le cancer de l'ovaire. Le premier axe de recherche implique l'utilisation du promoteur de l'AMHRII pour développer un modèle murin du cancer de l'ovaire. En 2003, Connolly et al. ont démontré que, quand la région de transformation qui contrôle le promoteur de l'AMHRII du virus simien 40 (SV40) était injectée dans des œufs de souris fécondés, environ 50% des femelles fécondées développaient des carcinomes ovariens peu différenciés qui se propagent de façon identique aux carcinomes péritonéales observés dans les cancers épithéliaux humains [61]. L'autre approche tente de capitaliser sur la nature tissu-spécifique du récepteur comme une cible attrayante pour le contrôle par immunomodulation du cancer de l'ovaire [56, 62]. L'utilisation d'anticorps dirigés contre l'AMHRII *in vitro* [62] et l'utilisation de ligand recombinant humain (rhAMH), à la fois *in vitro* et *in vivo* [60, 64] ont montré un potentiel thérapeutique anti-tumoral très prometteur. D'ailleurs en 2006, Pieretti-Vanmarcke et al. ont montré que l'association de rhAMH avec le schéma de traitement de chimiothérapie classique du cancer ovarien semble réduire la dose chimiothérapique nécessaire pour obtenir la même réponse thérapeutique [64].

Aujourd'hui, il existe déjà en clinique un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur AMHRII. Cet anticorps peut donc être couplé à un radionucléide afin d'être utilisé comme un radiopharmaceutique en radioimmunothérapie du cancer de l'ovaire.

CHAPITRE 2

LA RADIOIMMUNOTHERAPIE

La radiothérapie externe est aux côtés de la chimiothérapie et de la chirurgie l'une des stratégies thérapeutiques les plus utilisées dans le traitement des différents cancers. L'irradiation des patients se fait à l'aide d'un accélérateur de particule, ce qui limite à quelques exceptions près, son indication à un traitement locorégional des tumeurs. L'utilisation de rayonnements ionisants pour traiter des cancers diffus ou à un stade métastatique est donc exceptionnelle et la technique privilégiée dans ce cadre sera la chimiothérapie. Celle-ci présente, selon la multitude de traitements chimiques disponibles, une morbidité importante et parfois une certaine inefficacité.

La radiothérapie interne vectorisée est une alternative à la chimiothérapie, du moins dans son indication. Elle consiste à administrer au patient par voie locale ou systémique un agent pharmaceutique (vecteur) couplé à un isotope radioactif, naturel ou de synthèse. Le vecteur va aller se fixer spécifiquement sur la cible biologique. Les particules ou rayonnements ionisants émis par le radionucléide vont détruire sélectivement cette cible. Le vecteur peut être le radionucléide lui-même, un analogue métabolique, un peptide ou un AcM. Dans ce dernier cas, on parle de radioimmunothérapie.

I. Généralités sur la radioimmunothérapie

La radioimmunothérapie (RIT) est une forme de radiothérapie interne utilisant comme agent de vectorisation un anticorps monoclonal (AcM), reconnaissant un antigène (Ag) exprimé par les cellules tumorales et couplé à un radionucléide (Figure 3). Son efficacité provient essentiellement de la radioactivité qui provoque, selon une exponentielle décroissante, une irradiation à bas débit de dose, déposant une dose d'irradiation de façon hétérogène. L'AcM peut aussi contribuer à l'effet tumoricide en stimulant les mécanismes effecteurs du système immunitaire et en induisant une mort apoptotique. L'efficacité et la toxicité de la RIT dépendent donc de nombreux facteurs que sont l'anticorps, le radionucléide, l'antigène et les caractéristiques de la tumeur [65].

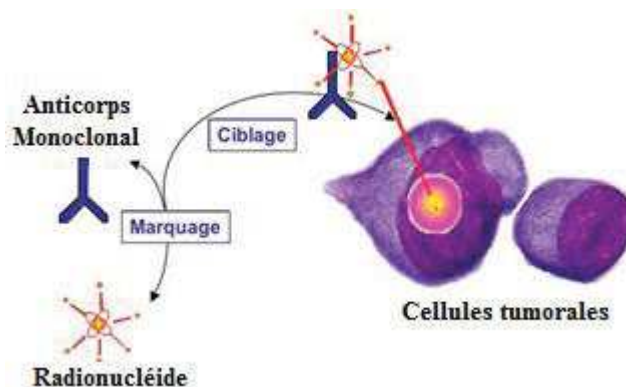


Figure 3: principe de la radio-immunothérapie

Développée depuis plusieurs années maintenant, cette approche thérapeutique a fait l'objet d'importants progrès notamment liés à la synthèse chimique de chélates de plus grande stabilité, au développement des techniques d'humanisation des AcM ou à l'optimisation des techniques de préciblage.

A. Indications de la RIT

Les cancers hématologiques sont la première indication actuelle de la RIT, notamment les lymphomes B Non-Hodgkiniens (NHL) [66]. Ils sont des cibles cliniques privilégiées pour la radioimmunothérapie, car ils expriment de façon très abondante des Ag caractéristiques et sont fortement radiosensibles [67, 68]. Les deux seuls radioimmunoconjugués utilisés en routine actuellement sont indiqués pour le traitement des NHL : le ^{90}Y ibritumomab tiuxetan (Zevalin[®]) a obtenu l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) aux États-Unis et en Europe, le ^{131}I tositumomab (Bexxar[®]) quant à lui, n'a été autorisé qu'aux États-Unis (il n'est plus utilisé en clinique aujourd'hui). Ces deux traitements ont démontré, lors d'essais cliniques, une efficacité supérieure aux traitements de chimiothérapie, prescrits jusqu'alors. Chez des patients présentant un NHL folliculaire de bas grade et réfractaires aux traitements de chimiothérapie, le taux de réponse global a été évalué à 65 % (28 % pour la chimiothérapie précédente) et les réponses complètes à 30 % avec une médiane de durée de rémission de 5 ans pour le Bexxar[®] [69].

Ces taux de réponse à la RIT sont encore plus élevés lorsque le traitement est utilisé en première ligne, c'est-à-dire chez des patients n'ayant préalablement pas reçu d'autres modalités de traitement. Dans un essai clinique de phase II concernant le lymphome non-Hodgkinien folliculaire de bas grade, on a ainsi observé après un traitement au Bexxar[®], un taux de réponse objective de 97 % et un taux de réponse complète de 63 % [70]. Dans un autre essai clinique de même type, mais cette fois-ci pour des lymphomes folliculaires avancés, Kaminski [71] a observé un taux de réponse complète de 75 %. Des taux de réponse similaires ont été observés avec le Zevalin[®] [72, 73]. La toxicité primaire observée lors de ces traitements est une myélosuppression transitoire. En général, la toxicité non-hématologique est, en revanche, minimale. Il n'y a pas, par exemple, de perte de cheveux, ou de mucosite comme dans le cas de la chimiothérapie. Il existe de nombreuses autres applications étudiées actuellement, telles que le traitement des leucémies [74] et des lymphomes à cellules-B agressifs réfractaires ou en rechute [75].

La RIT des tumeurs solides s'est avérée, en revanche, beaucoup moins efficace avec des taux de réponses objectives de moins de 2 % [76]. La radiosensibilité plus faible des cellules tumorales dans ces cancers ainsi que la faible pénétration des anticorps pourraient limiter l'efficacité de la RIT. Toutefois, dans le cadre de certaines tumeurs cervicales ou ovariennes, des injections intra-cavitaires d'anticorps radiomarqués après chirurgie ou non semblent montrer une certaine efficacité [77–79]. Malgré des résultats initiaux peu encourageants, les recherches se poursuivent pour les cancers du sein, colorectaux, pancréatiques, ou encore les cancers pulmonaires à petites cellules [80] en envisageant différentes méthodes d'optimisation de la RIT. À l'heure actuelle, dans le cadre des tumeurs solides, il semble que la RIT soit le traitement le mieux adapté à l'éradication des micrométastases et de la maladie résiduelle.

B. Paramètres clés de la RIT

Pour répondre à l'objectif principal de la RIT, détruire les cellules tumorales tout en épargnant les tissus sains, le rapport de l'activité concentrée dans la tumeur sur l'activité concentrée dans les tissus sains (Tumeur/Non-Tumeur ratio, ou T/NT) doit être le plus élevé possible. Ce paramètre clé de l'efficacité de la RIT va dépendre de plusieurs facteurs physiques, chimiques, biologiques et physiologiques du radioimmunoconjugué (anticorps + radionucléide) et de la tumeur à cibler [81].

1. Les anticorps monoclonaux

Les anticorps sont des glycoprotéines appartenant à la super famille des immunoglobulines (Ig). Toutes les protéines de cette famille possèdent au moins un motif commun structural, le « domaine immunoglobuline ». Cette région d'une centaine d'acides aminés (a.a) possède une structure secondaire caractéristique constituée de deux feuillets bêta antiparallèles superposés à la manière d'un sandwich. Cette structure est stabilisée par des liaisons faibles entre a.a hydrophobes et par des ponts disulfures formés entre résidus cystéine très conservés [82]. Chaque anticorps est formé de : deux chaînes lourdes (H pour Heavy) et deux chaînes légères (L pour Light) identiques deux à deux et reliées par des ponts disulfures. Classiquement, chaque chaîne lourde présente 3 domaines constants (nommé C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) et un domaine variable VH, pour une masse totale de 50 kDa ; chaque chaîne légère comprend un domaine constant CL et un domaine variable VL avec une masse totale de 25 kDa. Ainsi un anticorps entier monomérique, composé de ses 4 chaînes, présente une masse moyenne de 150 kDa. La combinaison des quatre chaînes peptidiques aboutit à une structure tridimensionnelle caractéristique en forme de « Y » (Figure 4) [83].

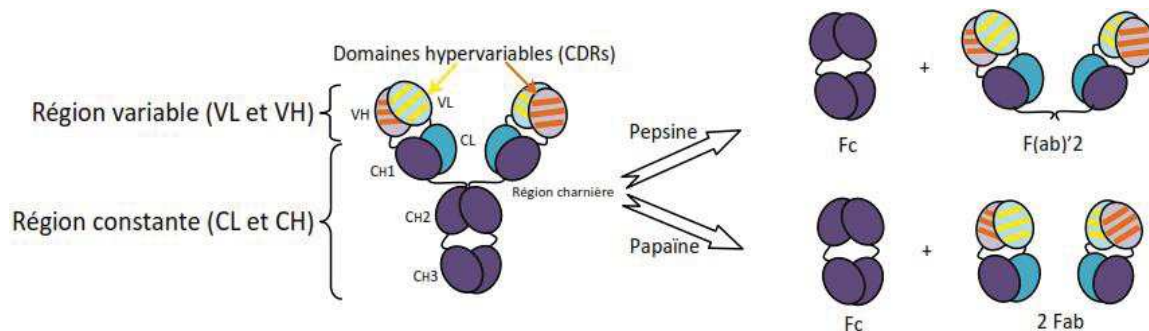


Figure 4 : structure d'une immunoglobuline d'isotype gamma (IgG) et de ses divers fragments [83]. Représentation schématique d'une IgG (à gauche) et les fragments obtenus par digestion enzymatique via la pepsine (en haut à droite) ou la papaïne (en bas à droite)

Au sein de chaque partie variable VH et VL, on distingue 3 régions hypervariables ou CDR (*Complementary Determining Regions*) de 5 à 15 a.a formant des boucles entre des régions charpentes ou FR (*Framework*). Les CDR des VL et des VH forment une zone particulière où se trouve généralement le paratope, région de l'anticorps responsable de la liaison à une zone spécifique de l'antigène ciblé nommée : épitope [84]. En effet, le paratope est constitué des régions hypervariables, qui, avec leurs séquences très peu conservées,

confèrent localement une organisation spatiale spécifique à chaque anticorps. Ainsi, un anticorps dispose de 2 sites de liaisons à l'antigène, un à l'extrémité de chaque bras.

Par ailleurs, la partie constante se caractérise par une séquence en a.a relativement conservée d'un anticorps à l'autre, mais porteuse tout de même de différences permettant de distinguer différentes classes appelées isotypes : IgG, IgA, IgM, IgE et IgD. Certains isotypes, les IgM et IgE, possèdent un quatrième domaine constant (C_{H4}) impliqué dans la dimérisation des chaînes lourdes. A la différence de la région variable, la région constante n'est pas ou peu impliquée dans la reconnaissance de l'antigène. Cependant, sa présence est essentielle pour assurer les fonctions effectrices des anticorps dans les réponses immunitaires. En particulier, au moyen d'une région communément appelée fragment Fc (pour fragment cristallisable), les Ig interagissent avec différents partenaires du système immunitaire tel que : le système du complément, ou encore des cellules de l'immunité innée (macrophages, granulocytes, cellules natural killer) qui tous présentent des récepteurs spécifiques au Fc (FcR).

Un récepteur particulier est impliqué dans le transport des IgG maternelles à travers le placenta et l'épithélium intestinal néonatal, le récepteur Fc néonatal (Fc γ Rn). Dans la période post-natale, les récepteurs Fc γ Rn sont également exprimés dans l'endothélium et dans de nombreux tissus épithéliaux, où ils protègent les Ig plasmatiques du catabolisme. Les Fc γ Rn lient les IgG circulantes, suivi de l'endocytose du complexe IgG-récepteur sous une forme qui protège les anticorps de la dégradation intracellulaire, les Ig sont ensuite relibérées dans la circulation. Ce processus répété d'endocytose suivi du recyclage dans le sang rend compte de la longue demi-vie systémique des anticorps [85].

Enfin, les anticorps peuvent être caractérisés par différents fragments obtenus par clivage enzymatique à la papaïne ou à la pepsine (Figure 4). La papaïne dissocie les bras du «Y» et permet d'obtenir 2 types de fragments différents : 2 Fab (Fragment having the antigen binding site) et le Fc. La pepsine digère l'anticorps au-dessous du pont disulfure de la région charnière, séparant ainsi le Fc et un fragment F(ab')₂ qui conserve les 2 paratopes. Ces fragments Fab conservent la capacité de liaison, mais acquièrent une meilleure capacité de pénétration au sein de la tumeur. La modification de la taille de la protéine permet, d'une part, d'augmenter le ciblage et, d'autre part, induit une élimination plus rapide. Cela entraîne un temps de résidence plus faible dans la tumeur que celui d'une IgG intacte. D'autres fragments ont également été obtenus par exemple le fragment scFv (*single chain variable fragment* : VH associé au domaine VL et reliés entre eux par une chaîne peptidique ; ~28 kDa) a largement été utilisé. Ces fragments sont souvent étudiés sous la forme de fusion à des toxines ou des cytokines. Il est également possible, toujours à partir de ces scFv, d'obtenir d'autres formats appelés minibody, bi-scFv, diabody, triabody, tetrabody, dont certains peuvent, tout comme les F(ab')₂, conduire à des fragments d'anticorps multivalents et multispécifiques [86].

Les premiers AcM étaient murins, avec pour conséquence une demi-vie courte, un faible recrutement des effecteurs immunitaires et une importante immunogénicité. Ils ont donc été progressivement humanisés, avec le développement d'AcM chimériques (suffixe -ximab, dont seule la portion variable est murine), humanisés (suffixe -zumab, dont seuls les CDR sont murins) et enfin rendus intégralement humains (suffixe -mumab ou -umab).

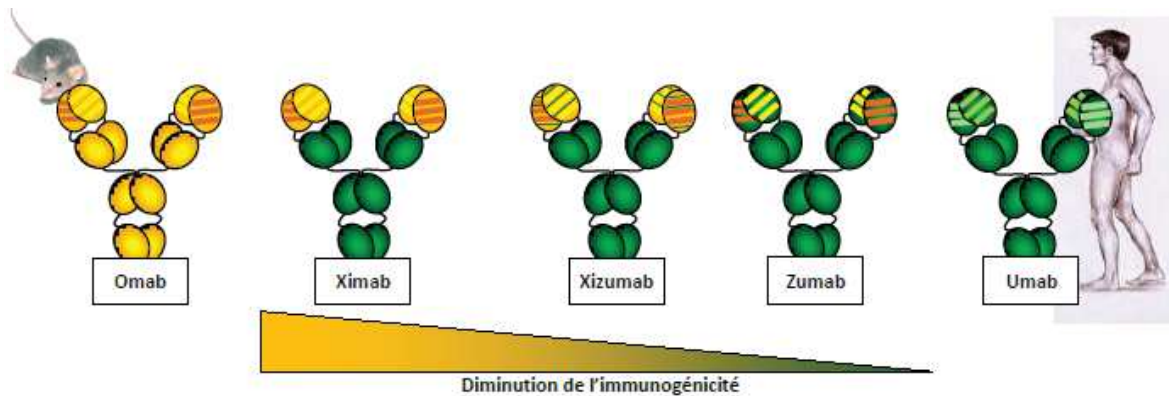


Figure 5 : différentes générations d'anticorps thérapeutiques : anticorps murins, chimériques, humanisés et humains [87]. Plus l'anticorps comporte des séquences humaines plus l'immunogénicité potentielle est réduite. Les suffixes appliqués aux noms des anticorps permettent d'identifier leur nature : -omab (murin), -ximab (chimérique), -xizumab (chimérique humanisé), -zumab (humanisé), -umab (humain).

Cependant, du point de vue clinique, la distinction des anticorps chimériques, humanisés et totalement humains est peu pertinente car ils ont tous une portion Fc humaine et parce que certains AcM totalement humains se sont avérés immunogènes, comme l'adalimumab (Humira[®], *anti-tumor necrosis factor α* [anti-TNF α]) dans la polyarthrite rhumatoïde [88]. Il est plus pertinent de les classer selon leurs mécanismes d'action. Ils peuvent en effet agir principalement soit par effet neutralisant ou agoniste, soit par effet cytolytique, en recrutant les effecteurs immunitaires.

Mécanismes d'action des anticorps thérapeutiques

La fixation de l'anticorps sur l'antigène a deux fonctions principales :

- *Le blocage de l'activité biologique de l'antigène*

Ces anticorps dits neutralisants se fixent sur un antigène soluble tel qu'une cytokine, dont ils inhibent l'action, comme le fait le bevacizumab (Avastin[®], *antivascular endothelial growth factor* [anti-VEGF]) ou se fixent sur un récepteur membranaire, qu'ils bloquent, comme le font les AcM dirigés contre la famille des récepteurs aux facteurs épidermiques (HER). Cette fixation peut parfois avoir un effet agoniste si, en se fixant sur le récepteur membranaire, ils entraînent des phénomènes post-récepteurs ou une apoptose, comme dans le cas des AcM anti-TNF α [89]. Dans le cas des effets neutralisants ou agonistes, c'est l'affinité de l'AcM pour sa cible, donc sa portion Fab, qui est l'élément déterminant de son efficacité.

- *L'élimination de l'antigène grâce aux effecteurs immunitaires (effets cytolytiques)*

Dans le cas des AcM cytolytiques, la portion Fc joue un rôle très important car elle est responsable du recrutement des effecteurs immunitaires conduisant à une lyse cellulaire. La réaction est dite de type CDC (*complement dependent cytotoxicity*) lorsque la protéine C1q du complément entraîne une lyse cellulaire dépendante du complément et de type ADCC (*antibody dependent cellular cytotoxicity*) lorsque ce sont les cellules effectrices du système

immunitaire porteuses du récepteur FcγRIIIA/CD16, (*natural killer* (NK) et les macrophages), qui induisent une lyse dépendante des anticorps.

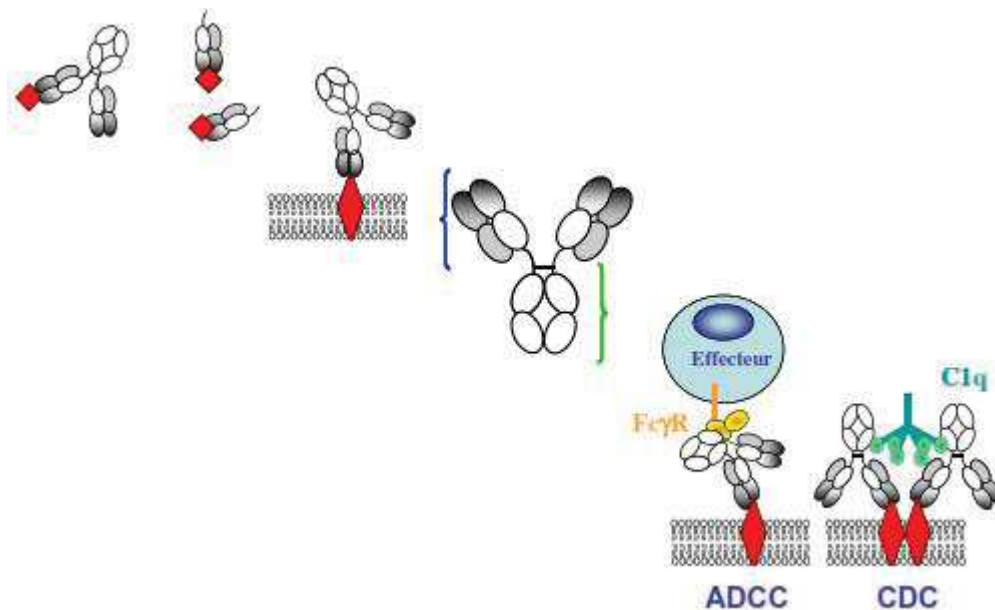


Figure 6 : mécanismes d'action des AcM thérapeutiques [90]. Pour les AcM neutralisants ou agonistes, c'est la portion Fab qui est déterminante et notamment son affinité pour l'antigène-cible (représenté en rouge), qu'il soit circulant ou membranaire. Pour les anticorps cytolytiques, la portion Fc joue également un rôle important car elle est responsable du recrutement des effecteurs immunitaires : fraction C1q du complément (complement dependent cytotoxicity ou CDC) ou cellules effectrices porteuses du récepteur FcγRIIIA/CD16 (antibody dependent cellular cytotoxicity ou ADCC).

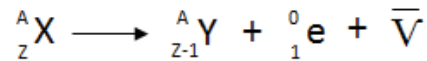
La portion Fc des AcM peut par ailleurs être modifiée pour supprimer leur affinité pour les récepteurs FcγR et donc leur capacité d'ADCC et de CDC ou, au contraire, pour augmenter leur affinité et donc leurs effets cytolytiques. Ces modifications portent sur la séquence d'acides aminés ou sur la glycosylation de la portion Fc [91]. Lorsque des AcM cytolytiques sont comparés, notamment dans des modèles cellulaires, il est donc important de ne pas considérer seulement leur affinité pour l'antigène-cible mais de prendre en compte aussi les caractéristiques de leur portion Fc. Certains tests d'activité *in vitro* permettent d'évaluer la qualité de la portion Fc d'un AcM quel que soit son antigène-cible.

2. Le radionucléide

De très nombreux radionucléides sont disponibles pour la RIT. L'idée principale guidant le choix du radionucléide est son adéquation avec le mode d'administration choisi, et le type de tumeurs à traiter. Dans le cadre de la RIT, la période physique du radionucléide doit être en rapport avec la cinétique de fixation et de rétention du vecteur utilisé. Une période physique trop courte entraînera un nombre élevé de désintégrations à l'extérieur de la cible, avant que le vecteur radiomarqué n'ait pu se fixer, et conduira donc à une irradiation non spécifique importante. À l'inverse, une période physique trop longue entraînera une irradiation à très faible débit de dose, qui sera beaucoup moins toxique pour la tumeur. Le second paramètre à considérer est le type de rayonnement émis par le radionucléide :

a. Émissions bêta (β)

Les particules β^- sont des électrons chargés négativement émis à partir du noyau d'un atome radioactif présentant un excès de neutrons. Après leur émission, le noyau fils possède un proton supplémentaire et un neutron de moins.



Le parcours des particules β^- est relativement long dans la matière (de quelques centaines de micromètres à quelques millimètres), ce qui permet d'envisager en radiothérapie vectorisée la destruction d'une cellule non ciblée du fait des émissions provenant de cellules adjacentes. Ce phénomène, appelé "feu croisé", permet l'augmentation de l'efficacité d'un traitement, puisqu'il n'est pas nécessaire de cibler l'ensemble des cellules à détruire, mais qu'il importe juste de cibler un nombre suffisant de cellules dans la zone à détruire. Les émetteurs β^- sont les radionucléides les plus employés pour la RIT, notamment l'iode 131 (^{131}I), l'yttrium 90 (^{90}Y), et le lutétium 177 (^{177}Lu) [92].

b. Émissions Auger

Les électrons Auger ont été découverts en 1923 par Lise Meitner mais c'est Pierre Auger qui, deux ans plus tard s'est vraiment intéressé au phénomène et lui a donné son nom [93].

Après un processus de capture électronique (CE) ou de conversion interne (CI), une vacance électronique est créée au sein de l'atome au niveau d'une couche électronique interne. Elle sera suivie par un réarrangement du cortège électronique. L'atome va retourner à un état stable par une transition électronique (saut d'un électron périphérique vers la place laissée vacante). Ce réarrangement électronique s'accompagne d'une émission d'énergie qui peut prendre deux formes :

- radiative : prédominante lors de vacances sur la couche K et résultant en l'émission d'un photon X caractéristique.
- non radiative : plus probable lors de vacances sur la couche L et sur les couches supérieures. Il s'agit des transitions Auger, Coster-Kronig (CK) et super CosterKronig (super CK) chacune conduisant à l'éjection d'un électron [94, 95].

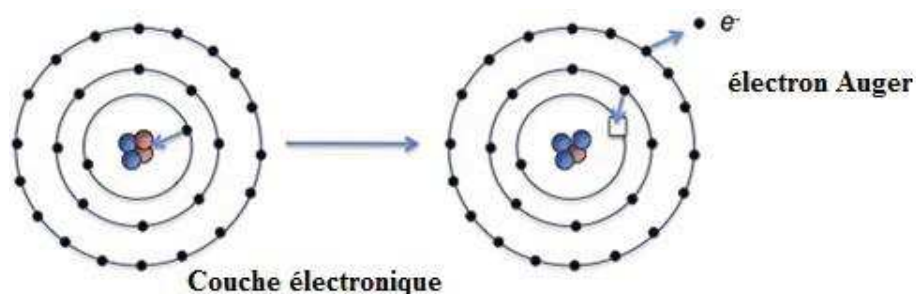


Figure 7 : schéma illustrant la formation des électrons Auger [96].

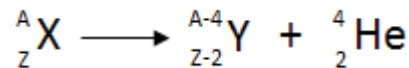
Ainsi, ces transitions non radiatives multiplient le nombre de vacances électroniques et induisent un phénomène d'émission en cascade d'électrons de faible énergie regroupés sous le

nom d'électrons Auger. Le processus d'émission d'un électron Auger est favorisé pour des éléments à faible numéro atomique à cause de leur faible énergie de liaison électronique.

Environ 5 à 50 électrons de différentes énergies sont créés après chaque CE ou CI, et à cause de leurs faibles énergies, ces électrons ont un parcours intracellulaire nanométrique (< 50 μm) [96]. Les électrons Auger possèdent une très faible énergie (< 25 keV). Plusieurs émetteurs Auger ont été utilisés en RIT, notamment l'iode 125, l'indium 111, le platinium 195 et le gallium 67. En raison du faible parcours dans les tissus, les radionucléides émetteurs Auger, semblent appropriés pour traiter des cellules isolées ou des micrométastases.

c. Émissions alpha (α)

Les particules α sont des noyaux d'hélium constitués de deux protons et deux neutrons. Ils sont le produit de la désintégration de certains radionucléides de Z élevé (>82).



Les particules α possèdent une énergie comprise entre 5 – 9 MeV qu'elles déposent le long d'un parcours relativement court (50 – 90 μm), correspondant à la traversée de 2 - 10 cellules. L'astate 211, le bismuth 212 et 213 et l'actinium 225 semblent être les émetteurs les plus prometteurs pour la RIT α. Leur faible parcours dans la matière permet une faible irradiation des tissus environnants (Figure 8). Elles semblent donc bien adaptées au traitement des cellules isolées (micrométastases) ou de petite taille.

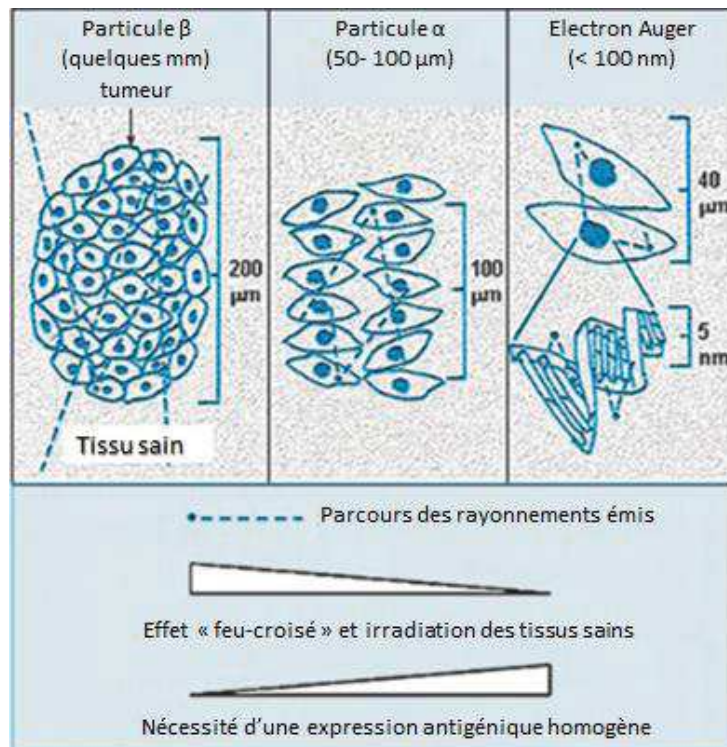


Figure 8 : schéma représentant le parcours dans la matière des radionucléides émetteurs de particules β, α et des électrons Auger [92].

d. Émissions gamma

L'émission de photons gamma suit généralement de près l'émission de particules alpha ou bêta qui laisse presque toujours le noyau dans un état excité. Ainsi, pour retourner dans son état stable, le noyau libère l'excédant d'énergie sous forme d'un rayonnement γ . Les photons γ ont un long parcours dans les tissus ; et leur émission augmente la dose corps entier, non spécifique, puisqu'un photon émis dans la cible va irradier les organes sains à distance. Néanmoins, quand leur énergie est comprise dans la plage de fonctionnement des gamma caméras (100 - 400 keV, avec un maximum d'efficacité autour de 150 keV), il est possible de faire de l'imagerie pendant le traitement. Ces images permettent d'évaluer la biodistribution de la radioactivité ; information nécessaire pour réaliser des études dosimétriques.

Néanmoins, des contraintes techniques peuvent limiter le choix du radionucléide. En premier lieu, il faudra tenir compte de sa disponibilité et de son coût de production. Ses propriétés physiques et chimiques vont également influencer son couplage à l'anticorps choisi. Le radiomarquage doit, en effet, être simple, reproductible et réalisable dans un temps acceptable par rapport à la période physique du radionucléide. L'activité spécifique obtenue à l'issue de cette phase de couplage, qui représente l'activité par unité de masse d'anticorps ou plus simplement la proportion d'anticorps radiomarqués, doit être la plus élevée possible afin d'augmenter l'efficacité anti-tumorale du traitement une fois injecté. Enfin, le couplage devra s'avérer stable *in vivo*. De très nombreux radionucléides, une fois détachés de l'anticorps, ont en effet un tropisme pour des organes sains : le bismuth 213 pour les reins [97], l'astate 211 pour la thyroïde et l'escotomac [98]. Une modification de la biodistribution due au manque de stabilité du radioimmunoconjugué peut donc entraîner une toxicité importante chez le patient.

3. La tumeur

Lors du diagnostic d'un cancer, le type, la physiologie et la localisation des tumeurs sont caractérisés à l'aide de l'imagerie médicale et de biopsies. Ces premières informations sont décisives dans le choix de la stratégie thérapeutique. Dans le cadre de la RIT, la localisation des tumeurs va décider de la voie d'accès des anticorps radiomarqués. Deux types d'injections sont possibles :

- une injection intra-cavitaire pour des cancers dont les cellules tapissent une cavité naturelle ou une cavité née de la résection d'une tumeur par chirurgie (glioblastomes),
- une injection systémique pour des cancers hématologiques ou solides non accessibles.

Le pourcentage de radioimmunoconjugués fixés par les cellules tumorales est un facteur limitant de la RIT. La vascularisation, les barrières à la pénétration des anticorps ainsi que la pression intratumorale et la nature de la maladie (masse tumorale importante *versus* petite tumeur) vont notamment influencer l'accumulation des anticorps dans la tumeur. Si l'accumulation dans la tumeur est faible, la dose tumoricide nécessaire ne peut pas être atteinte en raison de la dose limitante aux organes sains. En effet, augmenter l'activité injectée pour

augmenter la dose à la tumeur s'accompagnera d'une augmentation importante de la dose aux tissus sains et entraînera donc une toxicité. Dans le cadre de la RIT, l'organe sain critique est très souvent la moelle hématopoïétique.

Enfin, le dernier critère qui va beaucoup influencer l'efficacité de la RIT est la radiosensibilité des cellules tumorales. Les premiers succès obtenus en RIT l'ont été pour les lymphomes. Ce type de cancers est habituellement très radiosensible et la dose et le débit de dose nécessaires pour détruire les cellules tumorales sont, dans ce cas, beaucoup moins élevés que pour les tumeurs solides, par exemple.

C. Limitations et optimisations possibles

La RIT est étudiée depuis plus de 30 ans par de nombreuses équipes à travers le monde. Sur la base des différentes études pré-cliniques et cliniques menées, les limitations et difficultés liées à la RIT sont désormais bien connues.

La faible accumulation des anticorps dans la tumeur par rapport aux organes sains reste la principale limitation pour délivrer efficacement des doses élevées à la tumeur. L'efficacité de la RIT, comme précédemment évoqué, est basée sur le différentiel entre l'activité accumulée dans la tumeur et l'activité accumulée dans les organes sains. Plus ce différentiel est important, plus les activités injectées peuvent être augmentées afin d'améliorer la réponse thérapeutique. Plusieurs méthodes sont envisagées pour améliorer l'index thérapeutique, qui désigne le ratio des effets à la tumeur sur les effets aux tissus sains. Des vecteurs moléculaires plus petits (Fab, scFv) sont étudiés afin d'améliorer la perméabilité vasculaire de la tumeur. Ils ont montré un taux de clairance du sang très rapide ce qui limite leur toxicité hématologique.

Une autre solution pour accélérer le taux de clairance des anticorps dans le sang est le préciblage ou pretargeting. Cette méthode consiste à injecter en plusieurs étapes et séparément l'anticorps et le radionucléide afin de diminuer le nombre d'anticorps radiomarqués non fixés dans le sang. Plusieurs approches ont été étudiées. L'une d'entre elles consiste, lors d'une première étape, à injecter de l'avidine ou streptavidine conjuguée à un anticorps. Lorsque l'on estime que les anticorps non fixés ont disparu de la circulation, on injecte alors de la biotine radiomarquée qui va se fixer, avec une très grande affinité, sur l'avidine conjuguée aux anticorps [99]. Les essais cliniques utilisant cette méthode ont toutefois été décevants en raison d'une forte toxicité rénale [100, 101]. Une autre approche, appelée *Affinity Enhancement System* (AES), a également été développée. La technique AES requiert un haptène radiomarqué et un anticorps monoclonal bispécifique capable de reconnaître, d'une part, la cellule cible et, d'autre part, la molécule radioactive. Dans un premier temps, l'anticorps est injecté, suivi quelques jours plus tard après sa fixation sur les cellules tumorales, de l'haptène radiomarqué (injection diagnostique ou thérapeutique). De très bons résultats en matière d'imagerie de la tumeur ont ainsi été obtenus lors d'essais cliniques [102, 103].

La toxicité aux organes sains est le facteur qui empêche l'augmentation des activités injectées aux patients. Plusieurs techniques sont utilisées pour protéger les organes sains de

cette toxicité. Pour limiter la toxicité aux reins, des acides aminés ou sucres aminés sont administrés pour bloquer la réabsorption des fragments d'anticorps radiomarqués. Des facteurs de croissance hématopoïétiques voire des cellules souches du sang périphérique peuvent également être injectés au patient afin de contrer les effets myélosuppresseifs de la RIT. Le fractionnement, qui est un protocole au cours duquel les injections d'anticorps radiomarqués se succèdent dans le temps, permet de délivrer les anticorps radiomarqués, et donc des doses, de façon plus uniforme (la taille de la tumeur et le nombre de cellules pourraient diminuer après les premières administrations), de réduire la toxicité, d'augmenter la dose maximale tolérée et de prolonger la réponse. En revanche, le débit de dose délivré qui influence la réponse de la tumeur est plus faible. Le fractionnement requiert également l'utilisation d'un anticorps humanisé ou humain afin d'éviter toute réponse immunitaire consécutive aux injections répétées du radioimmunoconjugué. Les succès dans le traitement des tumeurs solides ont été très relatifs pour la RIT. Peu de réponses objectives ont été observées chez les patients. Pour dépasser cet échec, il a été envisagé d'associer la RIT à d'autres modalités de traitement et notamment la chimiothérapie. Des résultats pré-cliniques encourageants ont été obtenus [104]. Des études d'optimisation sont nécessaires afin de déterminer précisément comment administrer le plus efficacement possible les deux agents. Concernant les tumeurs solides, le rationnel pour la RIT reste probablement le traitement des micrométastases et de la maladie résiduelle.

II. Radioimmunothérapie des particules alpha et Auger

A. Radiobiologie des particules de fort transfert linéique

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

Le TEL est la quantité d'énergie délivrée par une particule par unité de distance parcourue dans la matière (Figure 9). Il est exprimé en $\text{KeV}/\mu\text{m}$.

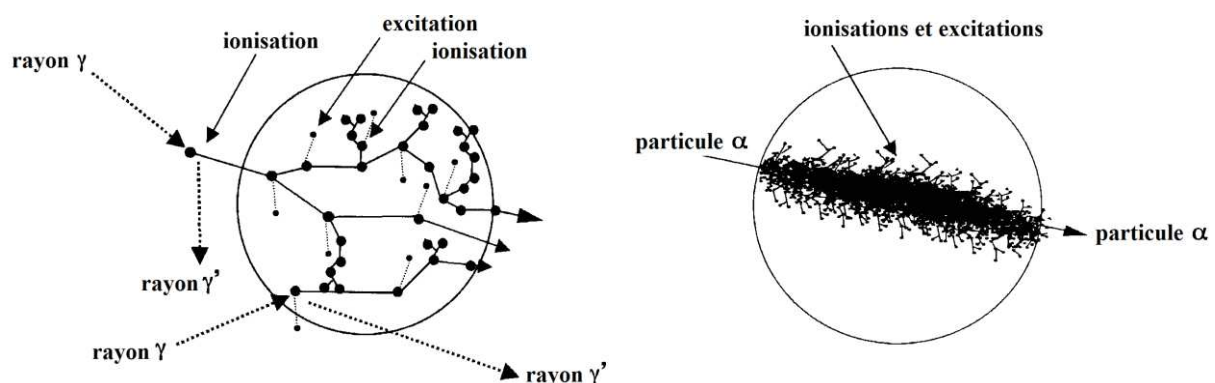


Figure 9 : parcours et densité d'ionisations des rayonnements de faible et fort TEL dans la matière [105].

Les particules β^- ont un TEL de $0,2 \text{ keV}/\mu\text{m}$. Elles sont qualifiées de faible TEL car provoquant très peu d'ionisation sur leur parcours (Figure 9). Il en est de même pour les photons γ . Les particules α quant à elles, possèdent un TEL de $60 - 230 \text{ keV}/\mu\text{m}$ (la moyenne est de $100 \text{ keV}/\mu\text{m}$) provoquant ainsi une très forte ionisation sur leur trajectoire. Elles sont qualifiées de particules de fort TEL. Au fur et à mesure du ralentissement de la particule α (dû aux pertes d'énergie dans les interactions), le TEL augmente et ce jusqu'à l'arrêt de la particule. Cela conduit à un dépôt d'énergie en profondeur en forme de pic (*pic de Bragg*), situé à une profondeur liée à l'énergie incidente de la particule (Figure 10).

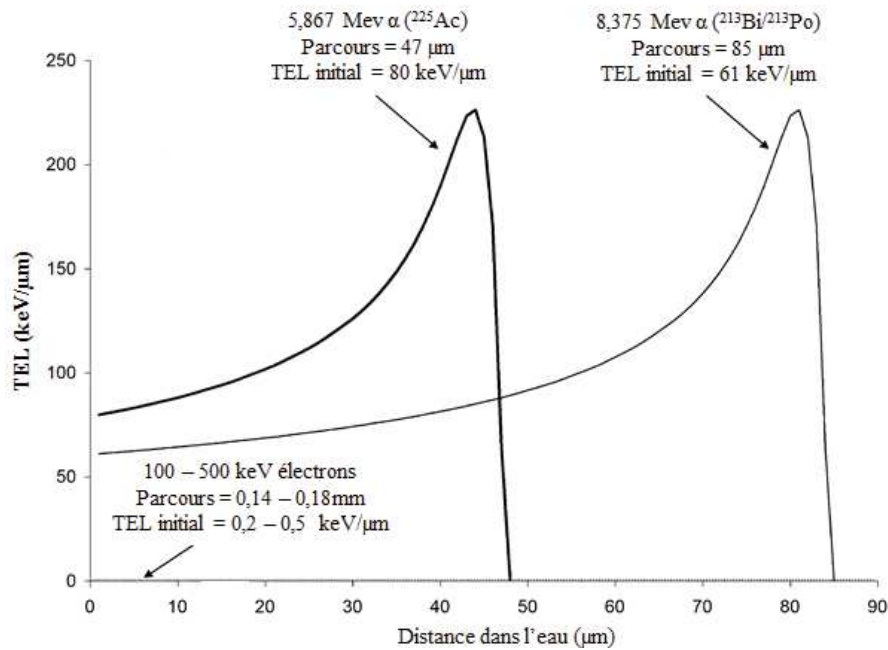


Figure 10 : parcours dans les tissus de particules α en fonction du TEL [106]. Les particules α émises avec un faible TEL sont plus proches de leur pic de Bragg et, donc débute avec un fort TEL. Le TEL des électrons (particules β^-) dont l'énergie est $100 - 500 \text{ keV}$ est aussi montré en bas de la courbe pour comparaison.

Les électrons Auger comparés aux particules β ont un TEL de 10 à 100 fois plus élevé ($4 - 26 \text{ keV}$) en particulier à de très faibles énergies (Figure 11) avec des ionisations très regroupées sur les premiers nanomètres. Leur parcours extrêmement court dans la matière entraîne un dépôt d'énergie localisé très dense. C'est cette principale caractéristique qui fait que ces électrons sont classés parmi les particules de fort TEL. Ils sont plus efficaces lorsqu'ils sont localisés à proximité ou dans la molécule d'ADN [107].

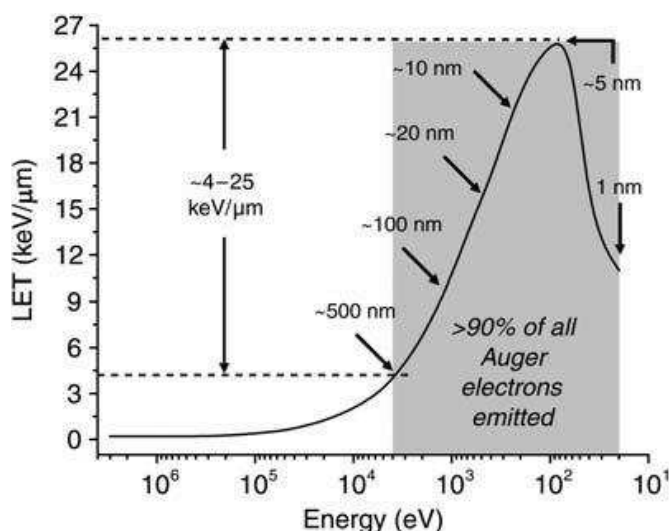


Figure 11 : transfert linéique des électrons Auger en fonction de leur énergie [108]. Les flèches indiquent le parcours moyen des électrons pour chaque énergie spécifique.

Les émetteurs de fort TEL (en particulier les particules α) présentent plusieurs avantages comparés aux émetteurs de particules β (de faible TEL):

Premièrement, le faible parcours des particules α dans les tissus biologiques permet de limiter l'irradiation à la tumeur (traversée de 2 – 10 cellules) et de protéger ainsi les tissus sains environnants, au contraire des émetteurs de particule β qui ont un long parcours dans les tissus (0,5 – 12 mm) correspondant à la traversée de 10 - 1000 cellules.

Deuxièmement, la désintégration α permet de délivrer une plus grande quantité d'énergie dans un volume plus réduit, ce qui lui confère une plus grande cytotoxicité à nombre de désintégrations équivalent. Leur TEL moyen est de 100 keV/ μ m, alors qu'il n'est que de 0,2 keV/ μ m en moyenne pour les particules β . Cela permet de délivrer une dose locale importante et de créer un grand nombre d'ionisations dans un volume réduit de l'ordre de quelques diamètres cellulaires. Des études ont démontré que seules 1 à 4 traces de particules dans le noyau d'une cellule pouvaient suffire à tuer celle-ci [109, 110]. Pour comparaison, la destruction d'une cellule nécessite plus de 20 000 traces de particules β dans le noyau de celle-ci.

Un troisième point de différence avec la RIT β concerne l'approche dosimétrique. Puisque seulement quelques particules alpha traversent la cellule tumorale, une approche microdosimétrique doit être considérée (voir dosimétrie des particules de fort TEL ; Partie III du chapitre 3).

Ainsi, par son ciblage précis, la RIT α ou Auger semble mieux adaptée que la RIT β pour le ciblage de cellules tumorales isolées [111, 112] et explique l'intérêt clinique de la RIT α ou Auger pour le traitement des tumeurs hématologiques. De plus leur grande capacité de destruction les rend intéressantes pour le traitement des tumeurs radio-résistantes.

2. Courbe de survie cellulaire : modèle linéaire quadratique

En radiobiologie, une cellule est qualifiée de viable lorsqu'elle conserve sa capacité de former des clones après une exposition aux rayonnements ionisants (RI). Les tests de clonogénicité sont normalement utilisés pour établir des courbes de survie en fonction de la dose exprimée en coordonnées semi-logarithmiques par l'équation : $S = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$. La première partie de la courbe est le reflet de la perte cellulaire par lésions d'emblée létales ($-\alpha D$). Progressivement s'associe aux pertes cellulaires par lésions létales, celles par accumulation de lésions sublétales. Il apparaît une incurvation progressive de la courbe appelée épaulement, qui s'explique par la diminution des réparations par saturation des mécanismes enzymatiques lorsque la dose augmente. C'est la composante quadratique de la fonction de survie ($-\beta D^2$).

Les courbes de survie des cellules irradiées par des particules de fort TEL sont caractérisées par des exponentielles sans épaulement. Cette observation semble indiquer que la toxicité d'une irradiation est liée aux passages individuels de particules dans le noyau et non pas à la combinaison des effets de dommages sublétaux induits par l'accumulation de passage de particules dans le noyau. Le modèle de survie est donc linéaire et non pas linéaire quadratique comme pour les particules β (Figure 12)

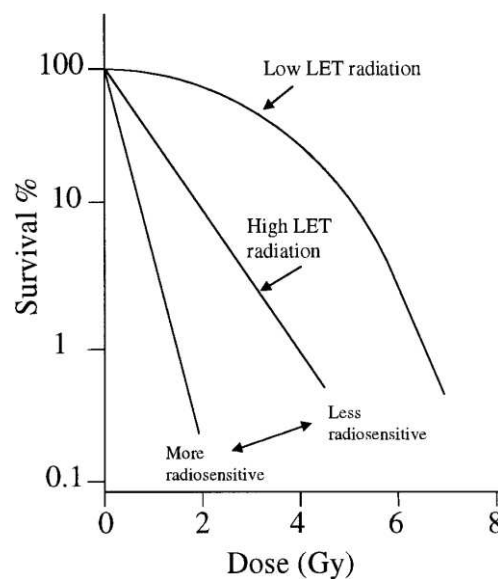


Figure 12 : courbe de survie typique observée lors d'une irradiation à faible ou fort TEL [105]

3. Effet de l'oxygène

Une plus grande radiosensibilité est observée pour les cellules exposées à une irradiation en présence d'oxygène. L'effet de l'oxygénation sur les paramètres cellulaires tels que la survie cellulaire est décrit par le ratio d'amplification de l'oxygène (RAO), qui représente le rapport entre les doses d'irradiation nécessaire pour produire un effet biologique, en absence et en présence d'oxygène, respectivement. Pour les particules α , l'effet radiosensibilisant de l'oxygène est moins marqué comparativement à un rayonnement de faible TEL (Figure 13)

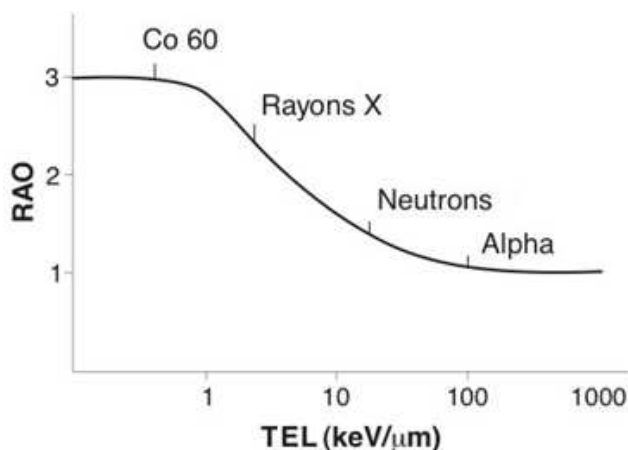


Figure 13 : ratio d'amplification de l'oxygène [113]

4. Débit de dose

L'influence du débit de dose absorbée sur la survie cellulaire dans le cas des émetteurs de faible TEL est bien établie. Comme le débit de dose est réduit pour une même dose, le temps d'exposition est prolongé et l'effet biologique est généralement réduit [114]. La principale explication de cet effet est que les débits de dose plus faibles fournissent un temps plus grand pour la réparation des dommages de l'ADN. Comme les dommages des particules de fort TEL sont plus difficiles à réparer, le débit de dose ou même une dose fractionnée ne devrait pas avoir un impact sur la survie cellulaire. Barendsen *et al.* en utilisant des microfaisceaux de particules α avec un débit de dose de 0,005 – 1 Gy/min n'a observé aucun effet de la variation du débit de dose sur la survie des cellules [115].

5. Notion d'efficacité biologique relative (EBR)

L'effet biologique des rayonnements ionisants est influencé par la dose absorbée, le débit de dose et la qualité du rayonnement. La qualité du rayonnement est caractérisée par la distribution spatiale de l'énergie transmise et de la densité d'ionisation le long du parcours à savoir le TEL [116]. Un fort TEL augmente donc la probabilité d'induire plus d'effets biologiques. Comparées aux électrons Auger (26 keV/ μ m) et aux particules β (0,2 keV/ μ m) les particules α ont un TEL plus grand (100 keV/ μ m). A dose équivalente (Gy), elles produiraient donc plus d'effets biologiques. Ainsi pour tenir compte de la différence du dépôt d'énergie des différents rayonnements, le concept d'efficacité biologique relative (EBR) a été établi. L'EBR a été introduite pour comparer l'efficacité de deux types de rayonnements entre eux en l'occurrence par rapport à un rayonnement X de 250 kV. Elle est définie comme le rapport de la dose du rayonnement de référence (rayons X de 250 kV) à la dose du rayonnement étudié produisant le même effet biologique.

Des valeurs d'EBR de survie cellulaire de 3 – 8 ont été relevées *in vitro* et *in vivo* dans des études utilisant des émetteurs de particules α [114, 117, 118]. Il a été supposé que la

principale cause de cette grande toxicité cellulaire est la fréquence accrue des cassures double brins de l'ADN observée avec les forts TEL comparé aux faibles TEL [119].

Toutes ces caractéristiques font des particules de fort TEL, des particules très prometteuses dans le cadre de la thérapie. Les nombreuses études pré-cliniques ont confirmé ces avantages et plusieurs essais cliniques sont en cours pour confirmer ce potentiel.

B. Indications de la RIT alpha et Auger

Les stratégies thérapeutiques développées pour le traitement du cancer sont globalement assez peu efficaces une fois que la tumeur a métastasé et que les cellules tumorales sont disséminées dans l'organisme. Des études ont montré que le ciblage de toutes les cellules tumorales n'était pas forcément requis pour obtenir une éradication efficace, et que la stérilisation d'une sous-population des cellules souches tumorales pourrait se révéler capitale pour l'efficacité du traitement [120].

L'éradication de ces cellules tumorales disséminées ou de la sous-population de cellules souches tumorales, nécessite (i) une thérapie ciblée systémique qui soit peu sensible à la chimio ou à la radiorésistance des cellules, (ii) assez puissante pour stériliser les cellules tumorales individuellement mais aussi les amas de cellules tumorales microscopiques (même à faible débit de dose et en condition hypoxique) et (iii) présentant un niveau acceptable de toxicité [121]. Les émetteurs de particules α et les électrons Auger répondent à ces critères. Ainsi, comme déjà indiqué, les indications naturelles de la RIT α et de la RIT Auger semblent être les tumeurs caractérisées par des cellules libres flottantes dans la circulation (lymphomes) et les micrométastases. La RIT α semble également appropriée pour traiter les cancers qui s'établissent sous la forme d'une fine couche à la surface des cavités (méningites néoplasiques, cancer ovarien). Leur court parcours dans les tissus permet d'épargner les tissus sains situés autour de la cavité [122, 123]. L'injection intracavitaire est également intéressante car elle permet de délivrer rapidement ces émetteurs à la demi-vie habituellement courte. L'élimination de maladies résiduelles après chirurgie est également très étudiée [124]. Le tableau 2 résume les essais cliniques impliquant des radiopharmaceutiques émetteurs de particules α .

Le premier essai clinique en RIT α réalisé en 1997 [125] a consisté au traitement de la leucémie myéloïde à l'aide de l'anticorps HuM195 radiomarqué au bismuth 213 (^{213}Bi). Quatre ans après le ^{213}Bi fut le premier radionucléide émetteur α proposé en clinique [126]. De nombreuses autres études cliniques utilisant le ^{213}Bi ont suivi dans plusieurs types de cancer : glioblastome [127], mélanome [128] et les lymphomes non-Hodgkiniens (NHL) [129]. L'anticorps chimérique ch81C6 qui cible la ténascine, une glycoprotéine surexprimée dans les gliomes a également été utilisé pour traiter les patients présentant une récurrence des tumeurs malignes du cerveau [124, 130]. Cet anticorps a été couplé à l'astate 211. Enfin notons que la première étude clinique de phase I de RIT α utilisant le plomb 212 comme radionucléide a été sponsorisée par Areva Med LLC, à l'université d'Alabama à Birmingham en 2011. Cette étude

avait pour but d'évaluer l'efficacité anti tumorale et la toxicité associée lors du traitement de carcinomes péritonéales en particulier celui d'origine ovarienne [131].

Tableau 3 : essais cliniques utilisant les émetteurs de particules α [132]

Trial	Cancer type	Radioimmunoconjugate	Outcome	Reference
Zalutsky and colleagues	Glioblastoma	^{211}At -ch81C6	18 patients treated; 14 patients survived 12 mo	27, 28
Andersson and colleagues	Ovarian cancer	^{211}At -MX35-F(ab') ₂	9 patients treated; no significant toxicity	29
The Scheinberg group	AML	^{225}Ac -HuM195 (^{225}Ac -lintuzumab)	18 patients treated; trial expanded to multicenter phase I/II	31, 32
Heeger and colleagues	B-cell non-Hodgkin lymphoma	^{213}Bi -labeled anti-CD19 and anti-CD20-CHX-A ⁺ -DTPA	9 patients treated; 2 patients showed response; limited toxicity in 2 patients	33
The Allen group	Melanoma	^{213}Bi -mAb 9.2.27	22 patients treated; 6% CR; 14% PR; 50% stable disease	34
The Scheinberg group	AML	^{213}Bi -HuM195 (^{213}Bi -lintuzumab)	18 patients treated; 14 patients had reductions in marrow blasts	35
Jurcic and colleagues	AML	^{213}Bi -HuM195 (^{213}Bi -lintuzumab)	31 patients treated; marrow blast reductions observed at all dose levels	36
The Merlo group	Glioblastoma	^{213}Bi -substance P	5 patients treated; Barthel index improved for 2 patients	37, 38
Areva Med LLC	Ovarian	^{212}Pb -TCMC-trastuzumab	3 patients treated; study ongoing; no further information available	39
Parker and colleagues	Castration-resistant prostate cancer and bone metastases	Alpharadin (^{223}Ra chloride)	292 patients treated; median overall survival increased by 4.5 mo compared with placebo group	40

NOTE: This is strictly speaking not a TAT trial *per se* but uses $^{223}\text{Ra}^{2+}$. Alpharadin is not an immunoconjugate but is included here because ^{223}Ra is an α -emitter.

Abbreviations: AML, advanced myeloid leukemia; CR, complete response; PR, partial response.

Concernant la RIT Auger, plusieurs études *in vivo* ont confirmé l'intérêt d'utiliser des électrons Auger par rapport aux émetteurs bêta conventionnels, en termes d'efficacité anti-tumorale associée à une toxicité non spécifique bien plus faible [133, 134]. L'activité maximale tolérée (MTA) pour l' ^{125}I a été estimée 10 fois supérieure à celle de l' ^{131}I . Le traitement de souris par RIT à l' ^{125}I couplé avec l'anticorps anti-A33 a permis un gain thérapeutique d'environ un facteur 2 par rapport à l' ^{131}I -A33 [135]. Ces études ont montré que ces radionucléides émetteurs d'électrons Auger peuvent ainsi être utilisés en RIT. Dans une autre étude, Ochakovskaya *et al.* [136] ont injecté des cellules de lymphome Raji à des souris immunodéficientes. L'AcM radiomarké anti-CD74- ^{111}In a été injecté à différents temps après la greffe. Une activité de 8,9 GBq à 12,3 GBq/souris a produit un effet thérapeutique important avec une croissance tumorale retardée. De plus, il a été décrit que l'intervalle de temps entre la greffe et l'injection de l'anticorps radiomarké avait une influence significative sur l'effet thérapeutique.

En 2003, Michel *et al.* [137] ont utilisé des anticorps anti-CD20 et anti-CMH classe II radiomarqués avec différents radionucléides (^{125}I , ^{131}I , ^{111}In et ^{67}Ga) pour traiter des souris greffées avec des cellules de lymphome Raji. Le ^{67}Ga a montré une meilleure efficacité de traitement des micrométastases que l' ^{111}In . Dans une étude complémentaire, ils ont évalué la capacité de différents radioimmunoconjugués à traiter des tumeurs sous-cutanées. Les souris immunodéficientes ont été greffées avec des cellules tumorales Raji, Daudi ou issues de lymphome B. Les anticorps anti-CD74, anti-CD20 ou anti-HLA ont été marqués avec l' ^{111}In ou l' ^{125}I et injectés aux souris à différents temps à partir du 5^{ème} jour de greffe. La croissance tumorale a ensuite été contrôlée. La thérapie des tumeurs sous cutanées (s.c) de lymphome B s'est avérée plus difficile que la thérapie des tumeurs qui avaient été injectées en intraveineux.

Bien que les tumeurs macroscopiques n'aient pas été efficacement traitées, la thérapie a été efficace sur les tumeurs issues des cellules Daudi 36 jours après l'injection d'anticorps anti-CD74- ^{111}In . Les anticorps anti-CD20 marqués à l' ^{111}In ou à l' ^{125}I ont été capables de traiter efficacement des tumeurs sous-cutanées. Les volumes tumoraux les plus importants efficacement traités avaient un diamètre de l'ordre de 2 mm. Bien que les masses tumorales plus importantes n'aient pas été entièrement traitées, la thérapie s'avère efficace pour les tumeurs sous-cutanées [138].

Enfin, au sein de mon équipe, une étude *in vivo* de RIT à base d'AcM- ^{125}I a comparé l'efficacité d'un anticorps internalisant, se localisant au niveau du cytoplasme, à celle d'un anticorps non-internalisant, se localisant au niveau de la membrane cellulaire. Les résultats ont montré, sur un modèle de xéno greffe intra-péritonéale de cellules A-431_{CEA}, un retard de croissance tumorale significatif avec l'anticorps non-internalisant radiomarqué [139, 140] suggérant que la membrane cellulaire peut être une bonne cible dans le cas de l'utilisation des émetteurs d'électrons Auger.

La RIT Auger a également été utilisée en clinique lors de phase I/II [141–143]. Néanmoins, aucun résultat probant n'a été mis en évidence en termes d'efficacité en raison notamment de la taille trop importante des tumeurs ciblées, de leur radiorésistance et du stade avancé de la maladie.

C. Les différents émetteurs de particules alpha et d'électrons Auger

1. Les radionucléides émetteurs d'électrons Auger

Plusieurs radionucléides émetteurs d'électrons Auger sont disponibles pour la RIT (voir tableau 4). Mais plusieurs facteurs importants doivent être pris en compte dans la sélection de ces radionucléides : (i) l'énergie des électrons émis, (ii) le ratio des différentes énergies radiatives émises (par exemple, les rayons X et les photons γ) par rapport aux énergies non radiatives que sont les électrons Auger (ratio photon/électron (p/e)), (iii) la demi-vie physique du radionucléide, et (iv) la méthode de radiomarquage de l'AcM.

Tableau 4 : propriétés physiques des émetteurs d'électrons Auger [108]

Radionucléides	% électrons par désintégration	Demi-vie physique	Rendement nombre total d'électrons par désintégration		
			Electrons de long parcours %	Electrons de moyen parcours %	Electrons de très faible parcours %
¹²⁵ I	20	60,5 jours	20 (98%)	18 (86%)	8 (39%)
¹²³ I	11	13,3 h	11 (98%)	10 (89%)	5 (40%)
¹¹¹ In	15	2,8 jours	15 (98%)	14 (91%)	8 (53%)
⁷⁷ Br	5	57 h	7 (100%)	6 (95%)	3 (51%)
¹⁹³ Pt	30	4,3 jours	29 (97%)	28 (93%)	6 (21%)
^{195m} Pt	36	4 jours	33 (92%)	33 (79%)	7 (19%)
		Parcours TEL	< 0,5 μm 4 – 26	< 100 nm 9 – 26	< 2 nm < 18

Les émetteurs d'électrons Auger peuvent être divisés en deux grands groupes : les halogènes (¹²⁵I, ¹²³I, Bromo-77 (⁷⁷Br) et Bromo-88m (^{88m}Br) et les métaux (²⁰¹Tl, Platinium-195m (^{195m}Pt), ^{193m}Tl, ¹¹¹In, ¹¹⁴In, ^{99m}Tc, ⁶⁷Ga, ⁵⁵Fe, et le ⁵¹Cr). Parmi ces radionucléides, le ^{195m}Pt émet 33 électrons Auger par désintégrations et, par conséquent, présente le plus haut rendement en électrons Auger. Il est suivi par l'¹²⁵I avec 21 électrons, l'¹²³I avec 11 électrons, l'¹¹¹In avec 8 électrons et le ⁷⁷Br, ⁶⁷Ga, ⁵⁵Fe et ^{99m}Tc présentant 4 à 7 électrons par désintégration [144], [145]. La quantité d'énergie déposée par désintégration dans une sphère de 5 nm est beaucoup plus élevée pour le ^{195m}Pt (2000 eV) que pour l'¹²⁵I (1000 eV), l'¹²³I (550 eV), et l'¹¹¹In (450 eV) [144], [145]. Cependant, le platinium n'est pas disponible sans vecteur, et les considérations liées aux coûts et aux caractéristiques physiques ou chimiques limitent le choix de l'¹¹¹In (sa désintégration est suivie de photons γ très irradiants). Parmi ces radionucléides, l'¹²⁵I a un plus grand nombre d'électrons émis par désintégration. Parce que ce radionucléide a également une demi-vie plus longue (60 jours), le nombre total de désintégrations ayant lieu après son internalisation dans les cellules sera plus grande. Signalons néanmoins que la longue demi-vie physique de l'iode pourrait causer un problème de gestion des déchets.

L'iode 125 (¹²⁵I)

L'iode 125 est un radionucléide peu cher, et disponible pour une utilisation courante. L'¹²⁵I se désintègre dans un premier temps par CE pour donner le tellure 125m, puis par transition isomérique dominée par la CI (93%), le tellure retourne à un état stable. A chaque désintégration, l'¹²⁵I émet en moyenne 20 électrons dont approximativement 90% possèdent une énergie inférieure à 10 keV (19,8 keV en moyenne) [146]. La conséquence de leur très faible énergie est un parcours dans la matière extrêmement court. Il a été calculé que l'énergie absorbée autour du site de désintégration de l'¹²⁵I était de 80 eV/nm³ dans le premier nanomètre,

de 10 eV/nm³ dans le deuxième nanomètre et de 3 eV/nm³ dans le troisième nanomètre [95]. Ainsi, l'énergie déposée par les électrons Auger dans un petit volume autour du site de désintégration de l'¹²⁵I est très élevée.

2. Les Radionucléides émetteurs de particules alpha

Il existe approximativement une centaine de radionucléides émetteurs α , pour la plupart des noyaux lourds de numéro atomique supérieur à 82. Parmi ceux-ci, un nombre réduit est disponible pour une éventuelle utilisation clinique. Les différents critères permettant la sélection des isotopes émetteurs α d'intérêt sont les suivants:

- la disponibilité commerciale : Une production à l'aide de cyclotron est plus aisée et accessible que le retraitement de déchets nucléaires ;
- la demi-vie du radionucléide ne doit ni être trop courte pour une utilisation thérapeutique, ni trop longue, notamment pour les noyaux fils, qui peuvent suivre des voies d'élimination différentes des noyaux pères ;
- les processus chimiques nécessaires au couplage avec l'anticorps. Dans le cas, de radionucléides à demi-vie courte (comme le bismuth 213 produit à partir d'un générateur d'actinium 225), la durée de l'élution du générateur et des processus de purification doit être assez courte pour obtenir une activité suffisante, tout en garantissant une bonne pureté et qualité radiochimique ;
- le devenir du radionucléide dans les tissus biologiques.

La notion de générateurs *in vivo* a été introduite en 1989 par Leonard Mausner et son équipe [147]. Les générateurs de radionucléides, souvent appelés « vaches », sont des systèmes dans lesquels un radionucléide parent de longue demi-vie est utilisé pour générer *in vivo* en continu, par désintégration radioactive, un radionucléide fils d'intérêt de durée de vie plus courte et où le radionucléide désiré peut être obtenu sélectivement par des moyens chimiques.

Ce concept implique cependant que la chélation du radionucléide fils sur le vecteur soit similaire à celui du radionucléide père, afin que le radionucléide fils ne soit pas relâché de sa position initiale. Ceci est particulièrement important lors de l'étape de vectorisation. Plusieurs générateurs peuvent potentiellement être utilisés comme générateurs *in vivo* (Tableau 5). Le choix de ces systèmes est basé sur :

- les propriétés chimiques du radionucléide père, afin de facilement fixer le radionucléide fils sur le vecteur choisi ;
- la période radioactive du radionucléide père ; celle-ci doit être suffisamment longue pour pouvoir réaliser le marquage et la vectorisation *in vivo* jusqu'aux cellules cibles, et suffisamment courte pour que la décroissance en l'élément fils ait lieu au niveau de la cible avant élimination du vecteur par l'organisme.

Les radionucléides émetteurs de particules α les plus utilisés en thérapie sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 5 : les particules α utilisées en RIT [148]

Radionucléides	Demi-vie (h)	Emission lors de la RIT	E _{max} (MeV)	production
²¹² Pb	10,64	β^- CE	0,57	Générateur de ²²⁴ Ra/ ²¹² Pb
²¹² Bi	1,01	α β^- CE	6,09 6,05	Générateur de ²²⁴ Ra/ ²¹² Pb
²¹³ Bi	0,76	α β^- CE	5,87 5,55	Générateur de ²²⁵ Ac/ ²¹³ Bi
²²⁵ Ac	240	α CE	5,83 5,79	n-capture de ²³² Th ou ²²⁶ Ra (p, 2n) ²²⁵ Ac
²¹¹ At	7,21	α CE	5,87	cyclotron

○ *Le plomb (²¹²Pb)*

Il est disponible à partir d'un générateur à base de ²²⁴Ra qui a une demi-vie de 3,6 jours pratique et peut fournir une matière de qualité clinique en quantité suffisante pour l'administration aux patients. Le ²²⁴Ra dont il est le descendant, est produit à partir du ²²⁸Th qui est à son tour produit à partir de l'²³²U. Le ²¹²Pb a une demi-vie de 10,6 h et donne par désintégration β^- le ²¹²Bi de durée de vie plus courte (1,01 h). Le couplage du ²¹²Pb à des vecteurs (AcM par exemple) permet donc de l'utiliser comme un générateur *in vivo* du ²¹²Bi et ainsi contourner les inconvénients liés à la demi-vie plus courte de ce radionucléide. Le ²¹²Pb utilisé de cette façon présente de nets avantages par rapport aux émetteurs α de courte durée de vie à savoir le ²¹²Bi et le ²¹³Bi. Outre la commodité de la demi-vie de 10,6 h qui offre un temps de préparation et d'administration raisonnable, le ²¹²Pb peut fournir une dose 10 fois supérieure par unité d'activité injectée à la tumeur comparé aux deux radionucléides bismuth [149].

Cependant, la désintégration du ²¹²Pb fournit une énergie de recul d'une proportion significative (30% - 36%), une conséquence des électrons de conversion de l'émission γ qui accompagne cette désintégration [150] et qui pourrait détruire le chélate. Pour cette raison, il a été suggéré que des efforts soient faits dans le but de piéger le ²¹²Bi libre qui a un tropisme pour les reins, ceci en co-injectant des chélateurs tels que l'EDTA ou le DTPA avec le produit d'injection afin de faciliter l'élimination rapide du ²¹²Bi libre.

En dépit de ces limites, de nombreuses études pré-cliniques ont montré que des anticorps marqués au ²¹²Pb sont efficaces lorsqu'ils sont utilisés seul ou en combinaison avec des médicaments chimiothérapeutiques dans le traitement du cancer dans certaines applications où cette perte du ²¹²Bi est une préoccupation minimale, par exemple, une administration intrapéritonéale pour traiter une métastase locale ou une maladie résiduelle [151–153].

○ Le bismuth 212 (^{212}Bi)

Le ^{212}Bi , a une demi-vie de 60,6 min et est produit uniquement à partir de générateurs. Les radionucléides parents du ^{212}Bi , couramment utilisés pour les générateurs, sont le thorium 228 et le radium 224, qui sont tous deux issus de la décroissance naturelle du thorium 232 ($t_{1/2} = 1,4 \times 10^{10}$ ans) (Figure 14).

Le ^{228}Th peut être produit de deux façons. La première consiste à extraire et purifier une source ^{228}Ra à partir du ^{232}Th ; le ^{228}Th sera obtenu par séparation du ^{228}Ra . Cette opération pourra être réalisée chaque année pour obtenir une activité suffisamment importante [154]. La deuxième méthode de production du ^{228}Th est la double capture neutronique, suivi d'une décroissance β^- du ^{226}Ra . Les cibles du ^{226}Ra peuvent être produites à partir de l' ^{238}U .

Par contre le seul système de générateur disponible en clinique actuellement est le générateur $^{224}\text{Ra}/^{212}\text{Bi}$ produit par AREVA MED. A partir de ce générateur où le ^{224}Ra est adsorbé sur une résine échangeuse de cations organique (AGMP-50), on peut obtenir du ^{212}Pb de haute pureté qui va ensuite donner le ^{212}Bi d'intérêt. Un inconvénient du ^{212}Bi est l'émission de rayons gamma de haute énergie, en particulier de 2,6 MeV dans 36% des cas lorsqu'il se désintègre en ^{208}Tl . Cela nécessite une protection importante des personnels impliqués dans la production, la livraison ou le traitement des patients.

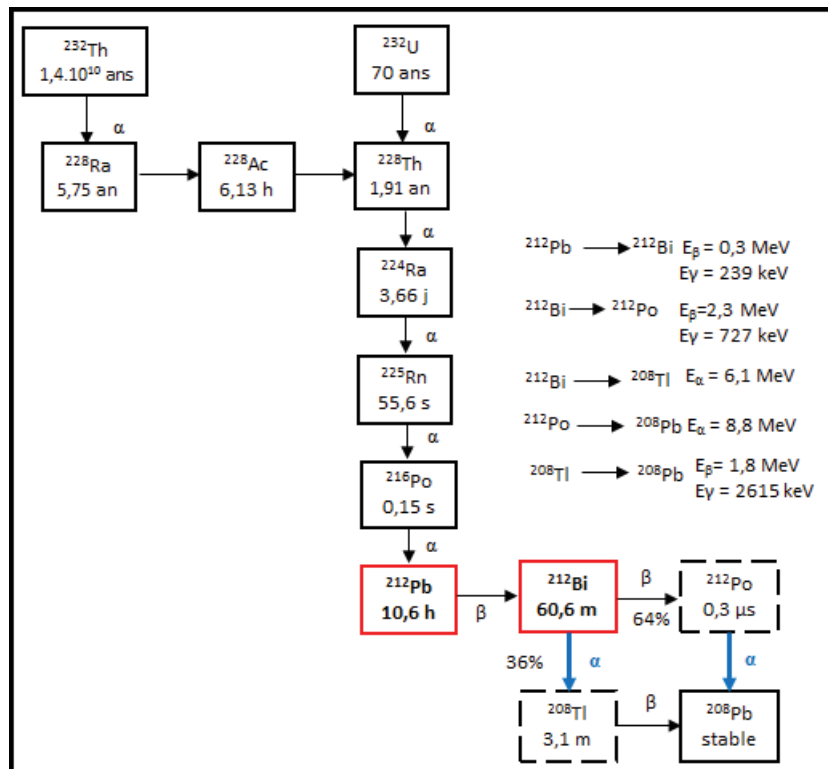


Figure 14 : schéma de désintégration de la production du ^{212}Bi et du ^{212}Pb [154].

○ *Le bismuth 213 (^{213}Bi)*

Le ^{213}Bi a une demi-vie de 45,6 min et peut être obtenu à partir d'un générateur $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$. Sa décroissance par émission α et β aboutit à l'obtention du ^{209}Bi stable. Son utilisation est toutefois limitée par sa courte demi-vie : 20% de l'émission α totale du bismuth est réalisée dans les 15 premières minutes après l'injection. Trois heures post-injection, seulement 6% de l'émission α totale persiste [155]. Il faut donc manipuler très rapidement, ce qui peut rendre les expérimentations parfois plus difficile.

L' ^{225}Ac qui est le radionucléide parent est piégé sur une résine échangeuse de cations organique (AGMP-50). Le générateur peut être utilisé pendant 10 jours pour la production de bismuth avec un minimum de protection. Le ^{213}Bi atteint l'équilibre séculaire avec l' ^{225}Ac toutes les 5h ; mais après approximativement 2,5h (150 min), 90% du maximum de l'activité du ^{213}Bi est disponible pour élution par le générateur. Le ^{213}Bi présente l'avantage d'émettre des rayons γ d'énergie inférieure (440 keV) appropriée pour l'imagerie.

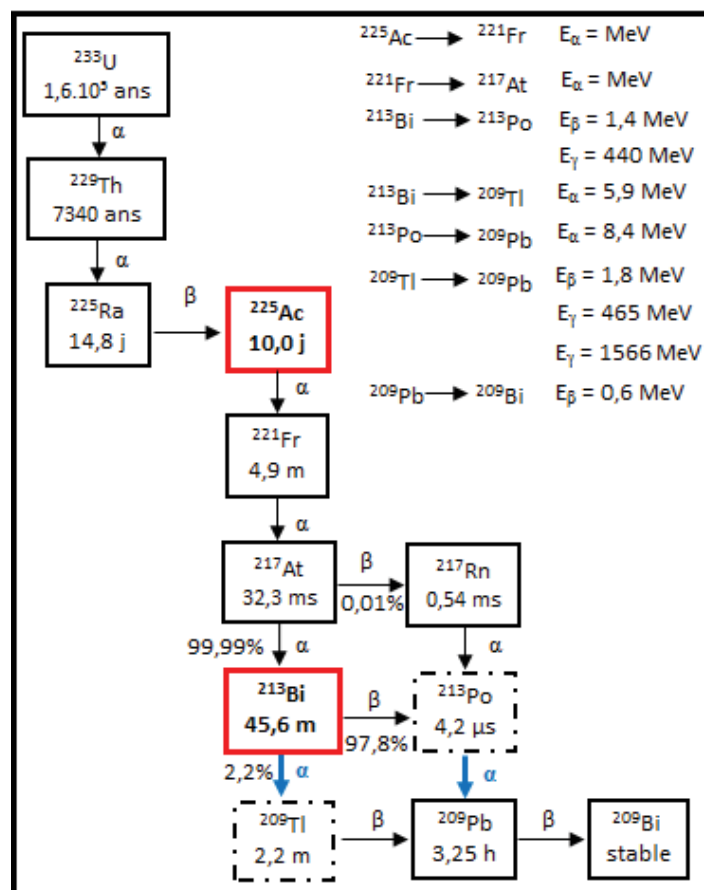


Figure 15 : schéma de désintégration de la production de l' ^{225}Ac et du ^{213}Bi [154].

○ *L'actinium 225 (^{225}Ac)*

L' ^{225}Ac peut être obtenu soit par désintégration naturelle de l' ^{233}U ou par irradiation neutronique du ^{226}Ra [156]. Il comporte 6 radionucléides fils dans sa chaîne de désintégrations

jusqu'au ^{209}Bi qui est stable (Figure 15). Pour chaque désintégration de ^{225}Ac , 5 particules α et 3 particules β^- sont émises, souvent de haute énergie. Comme mentionné pour le ^{212}Pb , la possibilité d'utiliser ^{225}Ac comme un radionucléide thérapeutique est limitée par la disponibilité de chélateurs capables de lier le radionucléide ainsi que ses descendants à travers la succession de désintégrations alpha [157].

Compte tenu de sa demi-vie de 10 jours, de l'émission de particules α de haute énergie et de la chaîne de désintégration rapide conduisant au ^{209}Bi stable, ce radionucléide serait un excellent candidat dans le traitement des cancers en utilisant l'approche de générateur *in vivo*. Cependant, il est très peu probable qu'un chélateur approprié capable de résister aux très fortes énergies de recul des particules α émises soit découvert (l'énergie de recul des particules alpha est habituellement comprise entre 100 et 200 keV, ce qui est légèrement supérieure à l'énergie de liaison d'un complexe macrocyclique d'ion métallique). Cela limite donc l'utilisation de ^{225}Ac comme générateur de production du ^{213}Bi .

○ *L'astate 211 (^{211}At)*

C'est l'émetteur α le plus prometteur en raison notamment de sa demi-vie qui est de 7,2 h. L'imagerie est possible. Au cours de sa décroissance, ^{211}At émet, en effet, différents photons dont l'énergie est comprise entre 77 keV et 90 keV (25 %). Un élément fils, le ^{207}Bi , émet, lui, des photons compris entre 73 keV et 75 keV (58 %) et entre 500 keV et 1,1 MeV (1,72 photons par désintégration). La disponibilité de ^{211}At est réduite car sa production nécessite un cyclotron de moyenne énergie avec un faisceau de particules α . Pour l'obtenir, on bombarde une cible de métal ^{207}Bi et on le récupère ensuite par distillation sèche. Le produit fils ^{207}Bi a une demi-vie de 33,4 ans. Ceci n'est pas vraiment problématique car l'activité du ^{207}Bi générée à partir de 37MBq de ^{211}At est 0.033 MBq [158].

○ *Le radium 223 (^{223}Ra)*

Le ^{223}Ra ($t_{1/2} = 11,4$ jours) est un produit de décroissance de l'uranium 231 qui, après plusieurs décroissances successives, conduit à un isotope stable du plomb 207. Des générateurs d'actinium 227 ont été conçus et permettent d'obtenir par élution du ^{223}Ra [159].

Le ^{223}Ra , utilisé sous forme de chlorure de radium, cible la croissance des métastases osseuses de certains cancers. Ce produit est aujourd'hui approuvé par la FDA pour le traitement des métastases osseuses de la prostate suite à une étude de phase III ayant démontré une amélioration de la survie globale et une progression symptomatique retardée [160]. Son nom de commercialisation est le Xofigo (anciennement Alpharadin).

Tous ces radionucléides étant des métaux, leur couplage à l'AcM pour une utilisation en RIT nécessite la présence d'une molécule dite chélatrice bifonctionnelle : elle se fixe par sa fonction SCN sur les fonctions libres NH_2 de l'AcM et par sa fonction macrocyclique sur une molécule du radiométal par des liaisons de coordinations.

3. Chimie de couplage des anticorps et les agents bifonctionnels chélatants (ABC)

Le couplage du vecteur (anticorps, peptides) au radiométal peut se faire de manière dite « directe », le radiométal est alors fixé directement sur le vecteur ou « indirecte », utilisant un agent bifonctionnel chélatant (ABC) qui va se lier de façon covalente au vecteur et encapsuler le radiométal évitant ainsi son relargage dans l'organisme (Figure 16).

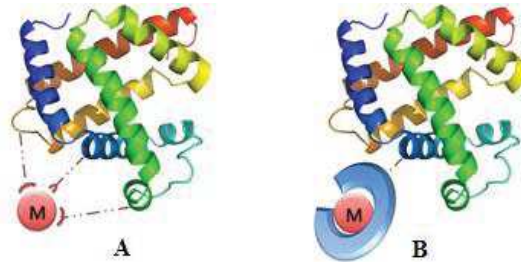


Figure 16 : illustration d'un radiomarquage métallique par voie "directe" (A) et "indirecte" (B) [161].

Il existe un intérêt continu dans le domaine de la synthèse des ABC, leur conjugaison à des AcM et des peptides, et leur utilisation subséquente pour la séquestration des ions métalliques radioactifs dans le cadre des applications telles que la RIT et la radio-immuno-imagerie (RII) [162, 163].

Les agents chélatants doivent répondre à des exigences strictes pour être utiles pour ces applications, les plus importantes étant la thermodynamique et la stabilité cinétique du complexe métal-chélate *in vivo* [164]. La grande variété de radionucléides utilisés pour l'imagerie et la thérapie (les lanthanides et les actinides), nécessite la conception de ligands adaptés [155].

Sur les protéines, les principales cibles des fonctions de greffage sont les fonctions réactives des acides aminés naturels disponibles. On ciblera donc majoritairement les amines primaires en N-terminal de la chaîne polypeptidique et des résidus lysine. La fonction thiol de la cystéine ou le groupement phénol de la tyrosine sont également des cibles possédant un fort potentiel de bioconjugaison (Figure 17) [161].

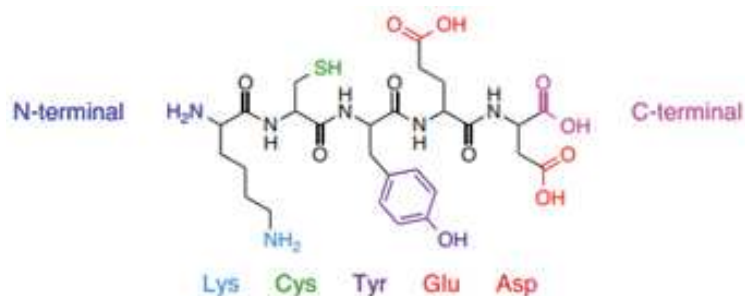


Figure 17 : principaux amino acides ciblés pour la bioconjugaison [161].

Les fonctions acide carboxylique présentes en C-terminal et sur les chaînes latérales de l'acide aspartique et de l'acide glutamique constituent aussi des cibles réactives intéressantes. Cependant, les réactions de bioconjugaison sur ces résidus restent compliquées du fait de la nécessité d'activer la fonction carboxylate avant de pouvoir initier une réaction de couplage. On assiste donc souvent à des réactions de couplages croisés entre deux protéines, favorisant la formation d'agrégats.

La liaison de l'agent chélatant se fera de préférence sur les amines primaires de la protéine. En effet, la lysine fait partie des acides aminés naturels les plus représentés, et les amines primaires sont des fonctions qui présentent des réactivités variées avec nombre de fonctions de greffage. L'agent chélatant portant donc un groupement de type isothiocyanate (groupe $N=C=S$) viendra alors se greffer sur cette fonction N-terminal de la protéine conduisant à la formation d'une liaison thiourée (Figure 18).

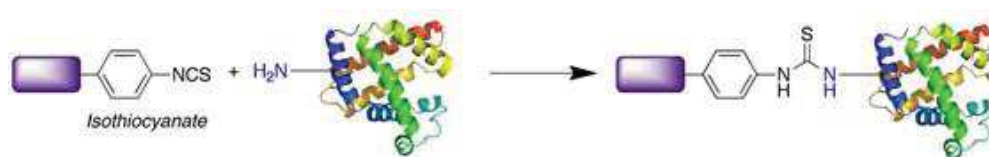


Figure 18 : la réaction entre une fonction isothiocyanate d'un agent chélateur et une amine primaire d'une protéine conduisant à la formation d'une liaison thiourée [161].

L'acide diéthylène triamine pentaacétique (DTPA) et l'acide tétraacétique 1,4,7,10 tetraazacyclododecane macrocyclique (DOTA) représentent les classes d'ACB les plus couramment utilisés en RIT. En règle générale, le DTPA et d'autres chélates acycliques présentent des taux de complexes d'association rapides, tandis que les chélates dérivés du DOTA et autres macrocycliques ont des taux de complexes de dissociation plus lente [148]. Par exemple l'utilisation du DOTA a démontré une grande stabilité *in vivo* pour les lanthanides tels que l'¹¹¹In, l'⁹⁰Y et le ¹⁷⁷Lu [165, 166].

Par contre l'utilisation du DOTA pour séquestrer le ²¹²Pb s'est avérée moins stable. En effet, lorsque le ²¹²Pb[DOTA] se désintègre en ²¹²Bi[DOTA], environ 36% de l'isotope du bismuth formé n'est pas lié au DOTA. Cette perte du ²¹²Bi par le ligand (DOTA) est attribuée aux rayons γ de conversion interne émis par les ²¹²Bi excités. Ce phénomène a également été observé dans des études pré-cliniques sur des souris porteuses de tumeurs traitées avec un anticorps couplé DOTA et marqué au ²¹²Pb. Une toxicité sévère à la moelle osseuse, soit directement fatale soit induisant une fenêtre thérapeutique très étroite, a été observée dans la plupart des cas [167]. Un autre inconvénient de l'utilisation du ²¹²Pb est la dissociation catalytique par l'acide du radiométal du chélate. Bien que cela ne pose aucun problème lorsque l'anticorps est fixé sur le récepteur membranaire, une fois internalisé l'environnement acide durant les processus métaboliques des protéines peu être préjudiciable au maintien du complexe ²¹²Pb[DOTA] [168].

La molécule TCMC (Figure 19) une variante du DOTA où les 4 groupements acides carboxylique sont transformés en amide (ajout d'un atome d'azote à chaque groupe carbonyle) a également montré une bonne stabilité avec des complexes métalliques notamment avec le ²¹²Pb [169]. Le remplacement des carboxyl par des amides devrait alors réduire l'action de

dissociation par l'acide du ^{212}Pb tout en fournissant un complexe plus stable du radionucléide avec cette nouvelle molécule. Même si cela n'a aucun impact sur le contrôle de l'émission des rayonnements γ lors de la désintégration du ^{212}Pb , le but est de garder le complexe le plus longtemps stable afin de s'assurer de l'internalisation dans la cellule avant l'apparition de cet évènement. Chappell *et al.* ont démontré plusieurs avantages du TCMC par rapport aux DOTA : une synthèse plus facile mais surtout les résultats de la conjugaison avec l'AcM CC49 montrent que le ratio chélateur/anticorps obtenu avec le TCMC conduit à un rendement de marquage supérieur (TCMC/CC49 de 2 – 4 contre 0,1 DOTA/CC49) [169]. L'immunoréactivité de l'anticorps était la même dans les deux cas. Ainsi ces avantages combinés incitent au choix du TCMC lors d'une RIT ou d'une RII lorsque le radionucléide utilisé est le ^{212}Pb .

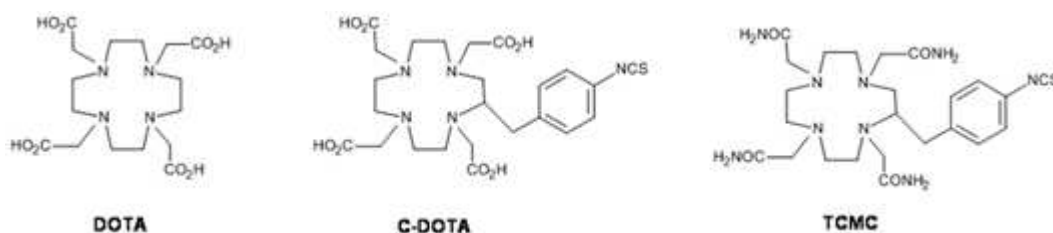


Figure 19 : structure sélectionnée de DOTA et de ses analogues en RIT [148]

Le DTPA est l'autre chélateur le plus utilisé. L'un de ses dérivés le 1B4M-DTPA également connu sous le nom de MX-DTPA ou tiuxétan, a été développé en tant que molécule chélatrice pour le Zevalin[®]. Il peut aussi être utilisé pour le marquage de ^{111}In . D'autres améliorations dans la pré-organisation géométrique des éléments du DTPA ont finalement abouti à la création du CHX-A" DTPA qui forme des complexes stables avec ^{111}In , ^{177}Lu , ^{213}Bi et qui est beaucoup plus stable que le 1B4M-DTPA surtout pour ^{90}Y [170, 171]. Le CHX-A" DTPA est connu comme étant le chélateur utilisé pour le premier essai clinique en RIT α avec un anticorps marqué au ^{213}Bi [172].

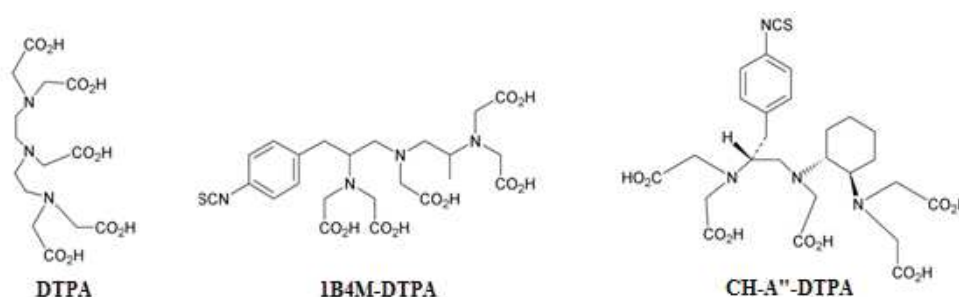


Figure 20 : structure sélectionnée de DTPA et de ses analogues en RIT [173]

III. Radioimmunothérapie et cancer de l'ovaire

A. Etudes précliniques

Plusieurs améliorations potentielles dans la RIT du cancer de l'ovaire par injection intrapéritonéale (IP) ont été étudiées dans différents modèles précliniques [174, 175].

Par exemple, Buchsbaum *et al.* [175] ont réalisé une RIT préciblée sur des xénogreffes IP de tumeurs ovariennes LS174T. L'anticorps CC49 (anti-TAG 72) couplé à la streptavidine a été injecté aux souris suivi plus tard (après élimination des anticorps non fixés) de l'injection du radionucléide (^{111}In , ^{90}Y et ^{177}Lu) couplé à de la biotine. Cette stratégie thérapeutique s'est avérée efficace en prolongeant la survie des souris traitées au ^{177}Lu ou à ^{90}Y .

Elgqvist *et al.* [122] ont évalué l'efficacité thérapeutique et estimé la dose délivrée lors de la RIT α du cancer de l'ovaire en utilisant les anticorps MX35 (anti- NaPi 2b) et MOv18 couplés à ^{211}At . Ces anticorps sont capables de reconnaître les antigènes de surfaces exprimés par les cellules OVCAR-3 xénogreffées. Ils ont ainsi pu montrer une forte efficacité de ces anticorps radiomarqués à ^{211}At sur les micrométastases.

Une autre étude utilisant ^{211}At a été réalisée en utilisant comme anticorps, le trastuzumab pour cibler le récepteur HER-2 exprimé par les cellules SK-OV-3 de cancer de l'ovaire [176]. Dans cette étude les auteurs ont évalué une dose unique ou fractionnée de l'anticorps non couplé et de l'anticorps couplé à ^{211}At . Ils ont observé une efficacité antitumorale plus grande lorsque la dose de trastuzumab non marqué administrée augmentait, ce qui n'est pas le cas pour la même dose de ^{211}At -trastuzumab administrée. L'administration de 500 mg de trastuzumab et de 400 kBq ^{211}At -trastuzumab était la dose qui montrait une stérilisation complète de la tumeur.

B. Etudes cliniques

Plusieurs études cliniques utilisant les radionucléides émetteurs β ont été réalisées pour la RIT des tumeurs ovariennes [177, 178]. En premier lieu on peut citer l'étude réalisée par Meredith *et al.* en 1996 [179]. Il s'agissait d'une étude de phase I d'injection IP de ^{177}Lu -CC49 sur 12 patientes présentant une chimiorésistance. Une efficacité anti-tumorale a été observée avec une bonne tolérance du radiopharmaceutique chez ces patientes. Une autre étude [180] utilisant le même anticorps, mais couplé à ^{90}Y en combinaison avec la chimiothérapie (paclitaxel) et une cytokine (interféron- α) a été réalisée. Cette étude de phase I a porté sur des patientes non répondeuses à l'une ou aux deux chimiothérapies préalables. L'utilisation de l'interféron- α avait pour but d'augmenter l'expression de l'antigène ciblé. Les résultats ont montré que la RIT ^{90}Y -CC49 en combinaison avec l'interféron- α et une injection IP de paclitaxel était faisable avec une dose de tolérance $\leq 895,4 \text{ MBq/m}^2$.

Verheijen *et al.* [181] ont réalisé une étude de phase III. Cette étude portait sur des patientes atteintes d'un cancer épithélial de l'ovaire (EOC) ayant eu une rémission clinique complète après chirurgie cytoreductive plus une chimiothérapie à base de platine. Elle consistait à comparer par administration IP l'efficacité de l'anticorps murin HMFG1 utilisé seul avec celle

du même anticorps radiomarqué à l'yttrium 90 (^{90}Y -muHMFG1). Les résultats de cette étude ont montré que l'administration IP de ^{90}Y -muHMFG1 n'augmentait pas la survie globale des patientes ni le délai de survie sans récurrence. Les auteurs ont ensuite montré que l'échec de ce traitement était dû à une dose insuffisante délivrée à la tumeur par la seule injection IP.

La RIT α a également été utilisée pour traiter le cancer de l'ovaire. On peut citer dans ce cadre, l'étude d'Andersson *et al.* [182] publiée en 2009, utilisant l' ^{211}At chez neuf patientes en rémission complète après chimiothérapie pour récurrence de carcinome ovarien. Il s'agissait d'une étude de phase I portant sur un traitement utilisant l'AcM MX35 marqué à l' ^{211}At . Le but de cette étude était de déterminer la pharmacocinétique du radioimmunoconjugué pour évaluer la dose absorbée et la toxicité. Cette étude a montré que l'administration IP de MX35 marqué à l' ^{211}At était possible sans toxicité significative aux doses testées.

Plus récemment, une autre étude de phase I a été réalisée [131] pour évaluer la distribution, la pharmacocinétique, l'immunogénicité et la réponse tumorale suite à une injection IP du trastuzumab anti-HER2 couplé au ^{212}Pb . Trois patientes ont été traitées par une injection IP unique de 5 doses croissantes de ^{212}Pb -TCMC-trastuzumab. Les résultats obtenus montrent une faible toxicité du traitement aux différentes doses administrées. La dosimétrie effectuée a permis de montrer que les doses reçues par les organes étaient comparables à celles obtenues dans l'étude précédente utilisant le ^{211}At -MX35 (Fab')₂.

CHAPITRE 3

LA DOSIMETRIE EN RADIOTHERAPIE INTERNE VECTORISEE

L'objectif de la dosimétrie est de fournir un index qui peut être relié de façon pertinente à la réponse biologique. Ainsi, en se plaçant dans ce référentiel commun à tous les systèmes, les effets biologiques induits par différents vecteurs radiomarqués vont pouvoir être comparés. La dosimétrie interne des radionucléides développée dès 1920 dans le domaine de la radioprotection, permet d'évaluer la quantité d'énergie absorbée par l'élément cible. Cette énergie délivrée à un organe ou à une cellule dépend de plusieurs paramètres : le type de radionucléide et son type d'émission, l'activité du radionucléide, la localisation de l'émission et la période effective (qui prend en compte la période biologique et la période physique du radionucléide).

Il est souvent difficile de définir ces paramètres précisément. En radiothérapie externe (RTE), de nombreux logiciels sont couramment utilisés en routine pour le calcul de dose délivrée aux organes et à la tumeur. A l'échelle cellulaire (RIV), il devient beaucoup plus difficile de définir la dose. Le formalisme du MIRD (*Medical Internal Radiation Dose*) [183] utilisé en médecine nucléaire à l'échelle de l'organe peut s'adapter à la cellule.

I. Le Formalisme du MIRD

Publié sous forme de pamphlets, ce formalisme permet de calculer la dose moyenne dans une région cible à partir d'une irradiation venant d'une région source. Il repose sur l'hypothèse que l'activité est répartie uniformément au niveau de la région source et que la distribution de la dose absorbée est homogène au niveau de la région cible. Les pamphlets du MIRD proposent une méthodologie d'évaluation de la dose absorbée par les organes du corps humain, par les régions tissulaires ou des structures voxelisées pour des applications diagnostiques ou thérapeutiques en médecine nucléaire.

Les formalismes du MIRD et de la CIPR (commission internationale de protection radiologique) sont très similaires. Cependant, ils emploient des terminologies et des symboles différents pour les quantités dosimétriques fondamentales. Dans son pamphlet N° 21 [184], le comité du MIRD propose une correspondance entre les terminologies utilisées par les deux comités dans le but de standardiser la nomenclature.

Tableau 6 : nom et unité de chaque symbole utilisé dans le formalisme du MIRD et de la CIPR [184]

Quantity or parameter	MIRD Pamphlet 21	MIRD Primer (1991) (4)	ICRP publications (7,8,18)	Units or special name
Source region (or tissue)	r_S	r_n	S	
Target region (or tissue)	r_T	r_k	T	
Absorbed dose rate to target region	$\dot{D}(r_T, t)$	$\dot{D}(r_k)$ or \dot{D}_k	$\dot{D}_{T,R}$	Gy s ⁻¹
Activity in source region	$A(r_S, t)$	$A_0(t)$	$q_S(t)$	Bq
Absorbed dose rate per unit activity	$S(r_T \leftarrow r_S, t)$	$S(r_k \leftarrow r_n)$	Not defined	Gy (Bq s) ⁻¹
Dose-integration period	T_D	Assumed to be ∞	τ	s
Absorbed dose to target	$D(r_T, T_D)$	$D(r_k)$ or D_k	$D_{T,R}$	Gy
Administered activity	A_0	A_0	q_0	Bq
Fraction of administered activity in the source region	$a(r_S, t) = A(r_S, t)/A_0$	$f_n(t)$	Not defined	Unitless
Absorbed dose coefficient	$d(r_T, T_D)$	Not defined	$d_T(\tau)$	Gy Bq ⁻¹
Mean energy of the i th transition	E_i	E_i	E_i	J or MeV
Number of i th transitions per nuclear transformation	Y_i	n_i	Y_i	(Bq s) ⁻¹
Mean energy of the i th transition per nuclear transformation	Δ_i	Δ_i	Δ_i	J (Bq s) ⁻¹ or MeV (Bq s) ⁻¹
Absorbed fraction	$\phi(r_T \leftarrow r_S, E_i, t)$	$\phi(r_k \leftarrow r_n)$	$AF(T \leftarrow S, E_i)$	Unitless
Mass of target region	$M(r_T, t)$	m_k	m_T	kg
Specific absorbed fraction	$\Phi(r_T \leftarrow r_S, E_i, t)$	$\Phi(r_k \leftarrow r_n)$	$SAF(T \leftarrow S, E_i)$	kg ⁻¹
Time-integrated activity in source region*	$\tilde{A}(r_S, T_D)$	\tilde{A}_n	U_S	Bq s
Time-integrated activity coefficient†	$\tilde{a}(r_S, T_D)$	τ	Not defined	s
Equivalent dose to target	$H(r_T, T_D)$	Not defined	H_T	Sv
Radiation weighting factor	w_R	Not defined	w_R	Unitless
Absorbed dose to target by radiation type R	$D_R(r_T, T_D)$	Not defined	$D_{T,R}$	Gy
Radiation-weighted S	$S_w(r_T \leftarrow r_S, t)$	Not defined	$SEE(T \leftarrow S)$	Sv (Bq s) ⁻¹
Equivalent dose coefficient	$h(r_T, T_D)$	Not defined	$h_T(\tau)$	Sv Bq ⁻¹
Effective dose	E	Not defined	E	Sv

*This quantity was termed *cumulated activity* in 1991 MIRD Primer.
†This quantity was termed *residence time* in 1991 MIRD Primer.

○ *La dose absorbée*

La grandeur physique de base en dosimétrie interne est la dose absorbée. La dose absorbée moyenne $D(r_T, T_D)$ à un organe cible r_T sur une période d'intégration T_D après administration de l'élément radioactif, est définie par le rapport entre l'énergie moyenne $d\bar{\epsilon}$ cédée par le rayonnement ionisant à la matière, dans un élément de masse dm , tel que :

$$D(r_T, T_D) = \frac{d\bar{\epsilon}}{dm}$$

Où T_D est généralement pris comme infini (∞), les radionucléides généralement utilisé en médecine nucléaire ayant une demi-vie relativement courte. $D(r_T, T_D)$ s'exprime en Gray (Gy). Un Gray correspond à 1 J.kg⁻¹.

○ *Fraction d'énergie absorbées et fraction massique d'énergie absorbée*

Afin d'estimer la dose absorbée par les organes cibles, une quantité de base doit être tout d'abord déterminée. Cette quantité est appelée « fraction absorbée » et représente pour une quantité d'énergie donnée émise par une source radioactive E_i , la proportion d'énergie reçue par une cible. La fraction d'énergie absorbée $\phi(r_T \leftarrow r_S, E_i, t)$, à un temps après l'administration du radiopharmaceutique, est déterminée par l'équation :

$$\phi(r_T \leftarrow r_S, E_i, t) = \frac{\text{Energie absorbée par l'organe cible } r_T}{\text{Energie émise par l'organe source } r_S}$$

La fraction absorbée est une grandeur sans dimension. Si l'on divise $\Phi(r_T \leftarrow r_S, E_i, t)$ par la masse de l'organe cible $M(r_T, t)$, on obtient la fraction absorbée masique $\Phi(r_T \leftarrow r_S, E_i, t)$.

$$\Phi(r_T \leftarrow r_S, E_i, t) = \frac{\phi(r_T \leftarrow r_S, E_i, t)}{M(r_T, t)} \quad \text{s'exprimée en kg}^{-1}$$

○ *Energie moyenne par transformation nucléaire*

La dose absorbée par l'organe dépend également du type de rayonnement, de la fréquence et de l'énergie moyenne émise par désintégration radioactive du radionucléide. Sachant que chaque radionucléide peut émettre plusieurs types de rayonnements i , les différents paramètres sont reliés par l'équation suivante :

$$\sum_i \Delta_i = \sum_i E_i Y_i$$

Où Δ_i = Energie moyenne émise par transformation nucléaire (J.Bq⁻¹.S⁻¹)

E_i = Energie moyenne par transition nucléaire de type i

Y_i = Nombre de transitions nucléaires de type i par transformation nucléaire

○ *L'activité cumulée*

La dose absorbée dépend des mécanismes biologiques de fixation et d'élimination de la radioactivité dans les organes. Il est alors nécessaire de prendre en compte l'activité cumulée $\tilde{A}(r_S)$ qui représente le nombre de désintégrations nucléaires ayant eu lieu dans la source r_S pendant le processus d'exposition radioactive. Le calcul de l'activité cumulée peut être formalisé par l'intégrale de la variation d'activité $A(r_S, t)$ dans la source r_S depuis l'incorporation du radiopharmaceutique ($t=0$) jusqu'à son élimination totale, le plus souvent considérée comme infini, tel que :

$$\tilde{A}(r_S) = \int_0^{\infty} A(r_S, t) dt \quad \text{s'exprime le plus couramment en MBq.h}$$

Ainsi la dose moyenne D , exprimée en Gy, absorbée par la région cible r_S est donnée par l'expression :

$$D(r_T, T_D) = \tilde{A}(r_S) S(r_T \leftarrow r_S, t)$$

○ *Le Facteur S*

La combinaison des paramètres physiques et des données nucléaires spécifiques du radionucléide donnent lieu à une autre grandeur appelée facteur S . Le facteur S a été introduit par le comité du MIRD dans le but de simplifier la formule de calcul de dose. Il est donné par la formule suivante :

$$S(r_T \leftarrow r_S, t) = \sum_i \Delta_i \Phi(r_T \leftarrow r_S, E_i, t)$$

Le facteur S représente la dose moyenne absorbée par l'organe cible r_T , à un temps t après administration, par unité d'activité cumulée dans l'organe source r_S . Il s'exprime en Gy.MBq-1.S⁻¹. Le principe de réciprocité s'applique aux facteurs S , par conséquent:

$$S(r_T \leftarrow r_S, t) = S(r_S \leftarrow r_T, t)$$

Ainsi, dans l'expression du MIRD, l'activité cumulée prend en considération les aspects temporels du calcul de la dose (cinétique biologique et décroissance du radionucléide) et le facteur S prend en compte tous les aspects physiques (géométrie du modèle, rayonnements émis par le radionucléide et les dépôts d'énergie induits).

Les facteurs S peuvent être calculés par des méthodes analytiques ou pseudo-analytiques et des méthodes stochastiques (Monte-Carlo et point-kernel) en utilisant des modèles dosimétriques standards ou personnalisés. Ces valeurs sont également disponibles sous la forme de tables pour un grand nombre de radionucléides et de combinaisons géométriques qui vont de la sphère à des modèles plus complexes (mathématiques ou voxélisés).

II. Dosimétrie multi-échelles

Comme défini plus haut, l'objectif de la dosimétrie est de fournir un index que l'on peut relier de façon pertinente à la réponse d'une structure biologique. D'après cette définition, il convient de ne pas traiter les organes comme des masses uniformes, mais de bien caractériser les différentes composantes fonctionnelles qui les constituent. Dans le domaine de la radiothérapie externe, les doses délivrées aux organes suffisent pour prédire la réponse biologique de ces derniers. Ce principe repose sur la bonne uniformité des dépôts de dose dans les organes. Chaque partie d'un organe va en effet recevoir une dose égale à la dose totale reçue par l'organe entier. Une des principales caractéristiques de la RIT et plus généralement de la radiothérapie vectorisée est, au contraire de la RTE, la distribution non uniforme de l'activité au sein des organes ou des tumeurs. Les diverses composantes d'un organe recevront des doses variables, et différentes de la dose reçue par l'organe entier.

Ainsi, la réduction de l'échelle de calcul depuis l'organe jusqu'à la cellule a pour but de mieux prendre en compte la distribution hétérogène du radionucléide. Cette évolution est particulièrement nécessaire pour l'étude des particules dont le parcours dans la matière est faible (particules α et les électrons Auger) et pour les traitements dont les cibles sont de faibles dimensions.

A. Dosimétrie organe

La dose moyenne absorbée par un organe ou la tumeur est le paramètre considéré dans la majorité des études sur patients. Le volume et la position de chaque organe peuvent être déterminés à partir d'images anatomiques (IRM ou CT) par segmentation automatique ou contourage manuel. Les facteurs S , corrigés ou non de la masse, pourront être déterminés à partir des tables existantes, ou bien calculés par Monte-Carlo ou Point-Kernel comme décrit

dans le pamphlet N°5 révisé du MIRD [185]. L'activité cumulée dans l'organe et dans les organes voisins sera, déterminée à partir des techniques d'imagerie (tomographie d'émission monophotonique SPECT ou tomographie d'émission de positon TEP) ou par des comptages externes avec des détecteurs adaptés (sonde NaI ou compteur Geiger Muller).

B. Dosimétrie multicellulaire et cellulaire

La dosimétrie multi-cellulaire est très importante lorsque l'on s'intéresse à de petits amas cellulaires. Dans des tumeurs de petites tailles (micrométastases), les doses reçues par les cellules peuvent être très variables et la réponse biologique va être reliée à la réponse collective de toutes les cellules [186]. Le calcul des doses délivrées à chaque cellule sera particulièrement pertinent quand les radionucléides se concentrent dans les cellules et/ou émettent des rayonnements dont les parcours sont comparables aux dimensions des cellules (électrons Auger ou particules α). La dosimétrie multicellulaire et cellulaire nécessite une quantification de l'activité dans des dimensions réduites (des dizaines à des centaines de micromètres). À l'heure actuelle, l'acquisition de la distribution de l'activité de ces volumes réduits pour effectuer la dosimétrie à partir de l'imagerie *in vivo* est impossible. Cependant, les mesures peuvent être effectuées en utilisant des échantillons de tissus acquis par biopsie ou par autopsie. Des techniques autoradiographiques utilisant des films ou des plaques de phosphore peuvent ensuite être appliquées pour quantifier l'activité au sein des groupes de cellules (multicellulaire) et, dans une certaine mesure, à l'intérieur des cellules individuelles (en utilisant des techniques de films à haute résolution) [187].

La dosimétrie cellulaire semble particulièrement adaptée aux études biologiques actuelles qui s'intéressent fortement au micro-environnement tumoral. Plusieurs études se sont d'ailleurs focalisées sur les modèles de dosimétrie de cellule unique ou de cluster de cellules [74, 75, 77]. Les régions sources de ces modèles comprennent la surface cellulaire, le cytoplasme et le noyau. Ces modèles sont ensuite utilisés pour calculer les fractions absorbées et les facteurs S cellulaires en utilisant le schéma du MIRD. Les facteurs S cellulaires publiés dans les tables du MIRD sont basés sur un modèle géométrique qui suppose que les cellules et leur noyau sont de la forme sphérique. De plus, ces tables ne fournissent aucun facteur S correspondant à des irradiations provenant de cellules voisines de la cellule cible et ces tables sont limitées à des cellules dont le rayon est inférieur à 10 μm . Aussi, beaucoup s'attachent à développer des codes Monte-Carlo dans le but de déterminer des facteurs S plus adaptés au modèle cellulaire considéré et donc obtenir une dosimétrie plus proche de la réalité.

C. Dosimétrie voxélisée

Dans une image médicale, les voxels ont des dimensions de 1 à 4 mm, et représentent la zone la plus petite pour laquelle on peut obtenir une valeur relativement fiable de l'activité. La dosimétrie tissulaire ou du voxel peut être définie comme le calcul de la dose de rayonnement absorbée dans des régions tissulaires ayant des dimensions allant de centaines de micromètres à quelques centimètres [188]. Elle est généralement associée à l'imagerie tomographique (SPECT, TEP) ou des techniques d'autoradiographie pour la quantification de

l'activité. La dosimétrie au niveau du voxel est particulièrement intéressante dans des applications telles que la RIT, traitement du cancer de la thyroïde avec l'iode radioactif (*Radioiodine therapy of thyroid carcinoma*), et l'injection intra-tumorale des produits radio pharmaceutiques thérapeutiques.

Dans ces applications, les régions sources peuvent être définies comme des tumeurs individuelles ou des régions à l'intérieur même d'une tumeur. La tumeur comme les tissus sains reçoivent des distributions d'activité non uniformes d'après les variations de la pharmacocinétique (mode d'injection, absorption, site de fixation spécifique et la clairance) du radiopharmaceutique. Ces distributions non uniformes de l'activité conduisent à des profils non homogènes de la dose absorbée au sein de ces entités. Les «points froids» issus de cette non-uniformité de dose peuvent relancer la croissance de la tumeur; par conséquent, la dose moyenne absorbée à la tumeur ne peut pas être le paramètre le plus utile pour l'évaluation des résultats cliniques dans ces cas [189]. Le calcul des contours isodoses ou des histogrammes dose volume (HDV) de ces zones moins irradiées est par conséquent, souhaitable. La non-uniformité de dose observée est dépendante du spectre d'émission du radionucléide d'intérêt. Avec les particules de courte portée (émetteur de particule α , émetteurs β de faible énergie) les profils de dose seront plus hétérogènes alors que pour les rayonnements X ou γ la tendance de distribution de dose est homogène [188].

La méthode du point-kernel est la plus utilisée pour le calcul du facteur S à cette échelle, principalement en raison des exigences de calcul de la méthode Monte-Carlo et l'indisponibilité des tables de valeurs des facteurs S [190, 191].

III. Dosimétrie des particules de fort TEL

Il existe deux méthodes pour calculer l'énergie déposée par les particules de fort TEL. La première utilise le formalisme du MIRD pour calculer la dose moyenne à la cible (noyau cellulaire) pour différentes localisations de la source (surface cellulaire, cytoplasme ou le noyau). Des tables détaillées ont été établies pour diverses combinaisons de radionucléides émetteurs de particule α ainsi que des modèles de géométries cellulaires [192, 193]. L'utilisation de la dose moyenne absorbée est liée aux propriétés biologiques des rayonnements de faible TEL de telle sorte qu'un grand nombre, souvent plusieurs milliers d'événements de dépôt d'énergie statistiquement indépendants dans un seul noyau cellulaire est nécessaire pour induire un effet biologique manifeste. Dans ce cas, la variation statistique de l'énergie communiquée aux différents noyaux cellulaires est faible. En revanche, pour les rayonnements de fort TEL comme les particules α , l'effet d'un événement unique dans le noyau de la cellule est si grand que la dose moyenne absorbée peut être un indice trompeur de l'effet biologique. En effet, le nombre de particules α traversant le noyau cellulaire est souvent peu important, et donc les variations stochastiques deviennent importantes. Par ailleurs, le trajet de la particule à travers le noyau est également crucial. Une particule α qui traverse directement le noyau cellulaire déposera une grande quantité d'énergie, alors que celui qui frôle simplement la surface cellulaire déposera peu ou pas d'énergie.

La seconde méthode de dosimétrie des particules α ou des électrons Auger est la microdosimétrie qui tient compte de la nature stochastique de l'énergie déposée dans les petites cibles. La microdosimétrie a été initialement proposée par Rossi *et al* [194] pour expliquer la nature stochastique de l'énergie déposée dans la matière par un rayonnement ionisant externe. Elle a ensuite été adaptée au cas des émetteurs de particules α internalisés [195, 196]. Les grandeurs fondamentales de la microdosimétrie classique sont l'énergie spécifique (l'analogue microdosimétrique de la dose absorbée) et l'énergie linéale (l'analogue microdosimétrique du TEL) [197].

La figure 21 ci-dessous illustre le domaine d'application de la microdosimétrie qui se situe dans la partie où les fluctuations des dépôts d'énergie sont très importantes. Cette partie concerne les sites de faible masse donc de petite taille.

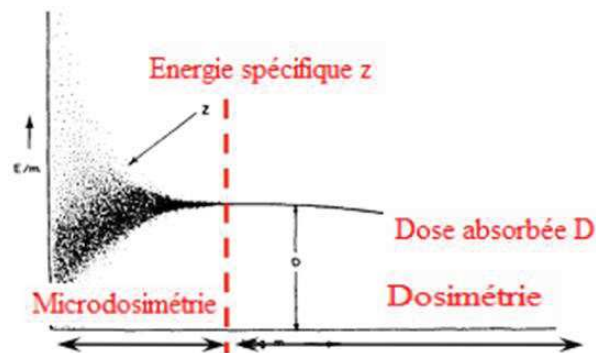


Figure 21 : représentation de la variation de l'énergie spécifique z en fonction de la masse [198]. z est la variable stochastique analogue à la dose mais au niveau microscopique. m représente le petit volume considéré. Plus il devient petit et plus les fluctuations sont importantes.

A. Techniques de calcul en microdosimétrie

Les spectres microdosimétriques peuvent être calculés en utilisant des méthodes analytiques ou les codes Monte Carlo [199]. Les méthodes analytiques utilisent des convolutions (*via* des transformées de Fourier) du spectre d'événement unique pour calculer les distributions d'événements multiples [194]. Le spectre d'événement unique représente le schéma des dépôts d'énergie spécifique de l'impact d'une particule α . Bien que les codes analytiques soit informatiquement efficace, ils sont souvent limités à de simples géométries source-cible, car le spectre d'événement unique doit être connue pour chaque configuration source-cible.

Les codes Monte Carlo offrent une souplesse plus grande que les méthodes analytique et peuvent simuler une grande variété de géométries et de configurations de source. Des modélisations sont souvent faites pour simplifier le codage et réduire le temps de calcul. Dans presque tous les codes de Monte Carlo, les particules α sont supposées voyager en ligne droite. Cette approximation est valable pour des particules α ayant des énergies inférieures à 10 MeV [197]. En outre, le parcours des particules (électrons énergétiques issus du trajet de la particule α et provoquant des ionisations secondaires à proximité de la trace) et la largeur de la trace de

cette particule (~100 nm) sont souvent ignorés parce que les cibles qui sont étudiées (noyau de la cellule) sont de dimensions supérieures [200].

B. Critères d'adoption de la microdosimétrie

Le choix d'utilisation de la microdosimétrie a été décrit par Kellerer et Chmelevsky [201]. Ils ont suggéré que les variations stochastiques de l'énergie déposée dans la cible doivent être prises en considération lorsque l'écart type relatif de cette énergie dépasse 20 % (lorsque le coefficient de variation des doses absorbées délivrées dans un même volume $\geq 0,2$). Par exemple, un petit noyau cellulaire de diamètre 5 μm , irradié par des particules alpha devrait recevoir une dose moyenne d'au moins 100 Gy pour que les écarts par rapport au seuil soient inférieur de 20 %. Ainsi, le choix d'utiliser la microdosimétrie dépendra de la distribution de la source, de la taille ainsi que la forme de la cible et la dose moyenne attendue. Pour les petites doses moyennes (telles que celles attendues pour les tissus non ciblés) la microdosimétrie peut être importante pour caractériser le motif du dépôt d'énergie et pour comprendre comment ce modèle se rapporte aux résultats cliniques. Cependant, dans une tumeur, où la dose moyenne peut être importante, un traitement microdosimétrique peut ne pas être nécessaire.

En conclusion, la quantité d'énergie déposée par une particule de fort TEL dans une cible de dimensions micrométriques est une variable statistique dont les fluctuations sont significatives. La microdosimétrie permet de prendre en compte ces fluctuations. La microdosimétrie correspond, en effet, à l'analyse systématique de la distribution microscopique des dépôts d'énergie dans la matière irradiée. Cette approche fournit des informations beaucoup plus complètes sur l'irradiation d'une structure biologique microscopique et semble donc appropriée pour étudier la réponse cellulaire aux particules. Elle sera fortement recommandée par exemple dans le cadre d'études d'irradiations cellulaires par des particules α .

CHAPITRE 4

LES EFFETS CIBLES DES RAYONNEMENTS IONISANTS

I. Chronologie des événements radioinduits

On entend par rayonnement ionisant, tout rayonnement susceptible d'ioniser une molécule d'air ou d'eau (à partir de 14 eV) [202]. Lorsqu'un rayonnement pénètre dans la matière, il peut interagir avec les atomes rencontrés et perdre, à chacune de ses interactions, une partie de son énergie. Cette énergie cédée est transférée au milieu par des ionisations et/ou des excitations constituant autant de microdépôts d'énergie dont la densité d'énergie conditionnera la nature biochimique des dommages induits [203].

Lors de son passage dans la matière, toute particule (électron, photon etc.) dépose son énergie suivant différents processus qui dépendent de sa nature, de son énergie initiale et des atomes rencontrés. Les étapes reliant le dépôt primaire d'énergie (échelle atomique) à ses conséquences biologiques (échelle cellulaire) sont nombreuses, complexes et pour certaines partiellement connues. Comme le montre la figure 22, ces étapes interviennent à des échelles de temps extrêmement différentes allant de 10^{-15} secondes (étape physique) jusqu'à des décennies (étapes biologique et clinique).

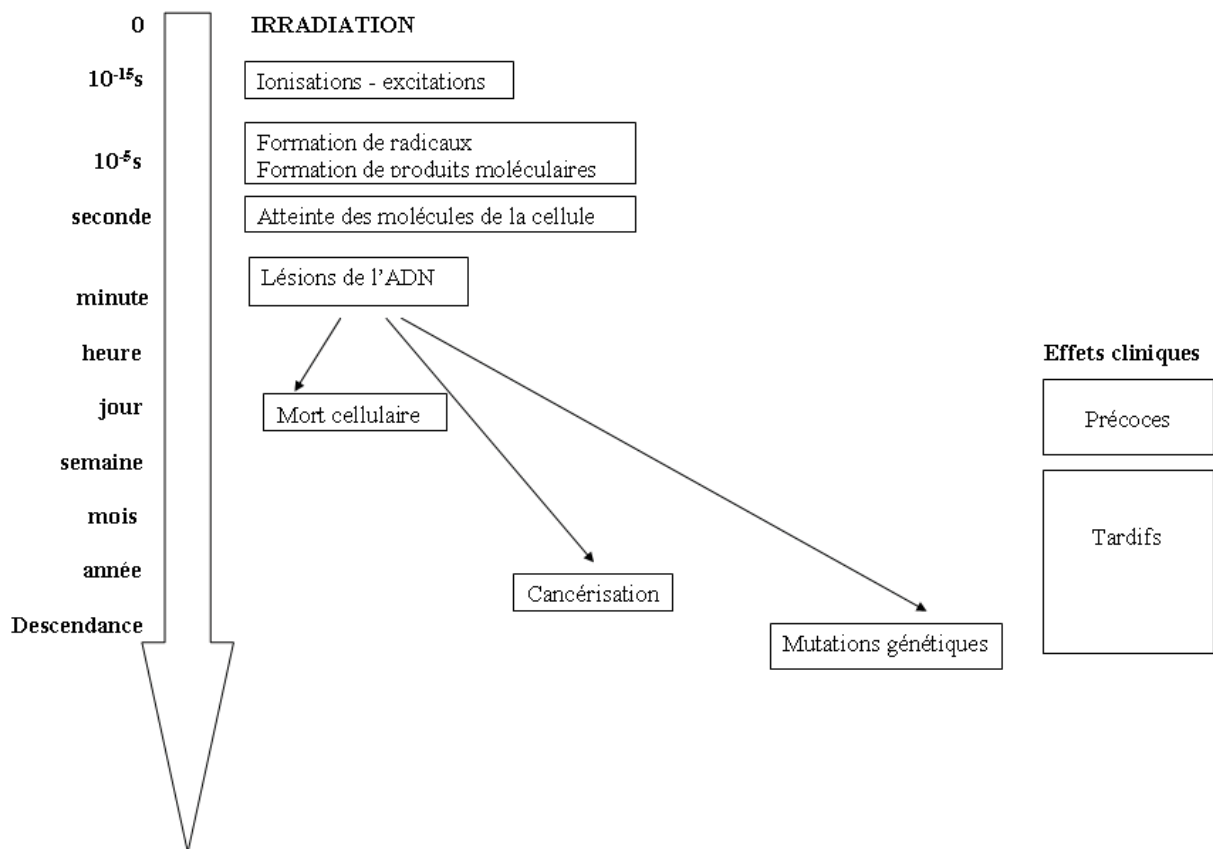


Figure 22 : chronologie des événements induits par les rayonnements ionisants dans l'organisme humain.

A. La phase physique

Un des enjeux de la radiobiologie est de mieux comprendre les mécanismes qui conduisent à la formation des lésions de l'ADN, principale cible des rayonnements, ainsi qu'à leurs conséquences biologiques et cliniques. De ce fait, il est indispensable de connaître la façon dont le rayonnement interagit avec la matière afin d'aborder les notions de base de la dosimétrie et de relier quantitativement l'effet biologique à la dose de rayonnement.

La phase physique consiste en effet au transfert de l'énergie du rayonnement incident au milieu biologique traversé. Elle regroupe tous les événements physiques provoqués par le rayonnement, et se produisant sur une durée inférieure à 10^{-13} seconde.

B. La phase chimique

Elle correspond aux réactions chimiques consécutives aux réarrangements moléculaires produits lors de la phase physique. Cette phase se situe de 10^{-5} à 1 seconde après l'irradiation. Les réactions chimiques en cause vont conduire essentiellement à la rupture des liaisons de covalence et donc à des scissions au sein des molécules ; créant ainsi des électrons célibataires communément appelés radicaux libres et qui vont réagir entre eux et avec les molécules du milieu.

A cette phase, les effets des rayonnements ionisants sont classés en deux types suivant le mode suivi pour atteindre la cible biologique (l'ADN). Lorsque l'interaction a lieu directement avec l'ADN, on parle d'effet direct et lorsqu'elle fait intervenir l'ionisation préalable de la molécule d'eau on parle d'effet indirect (Figure 23).

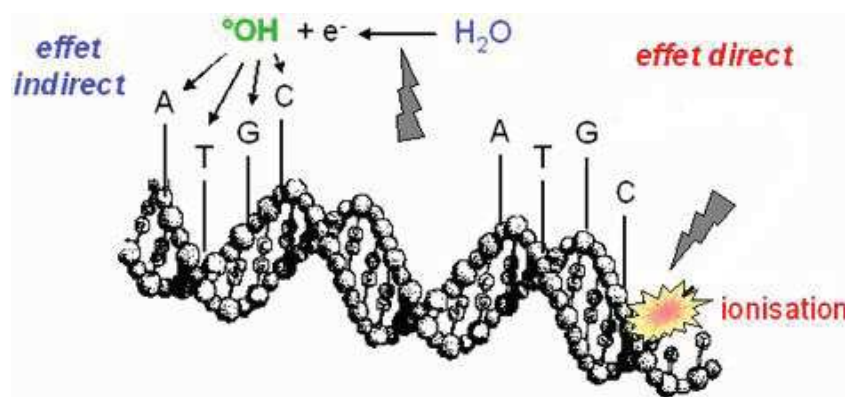


Figure 23 : effet direct et indirect des rayonnements ionisants sur l'ADN [198].

1. Les effets directs des RI

Ils concernent les effets produits par ionisation (apport d'énergie avec arrachement d'un électron) ou excitation (lorsque l'apport d'énergie est insuffisant pour arracher un électron) sur la molécule d'ADN et des molécules d'eau qui lui sont liées. Les bases pyrimidiques (thymine et cytosine) et puriques (adénine et guanine) perdent des électrons et des réactions de transfert de charge électriques se produisent en particulier le long de la chaîne d'ADN, avec une

localisation préférentielle sur les bases de type guanine et ainsi engendre la formation de la 8-oxo-guanine. L'effet direct est souvent observé avec les rayonnements de fort TEL alors que les rayonnements de faibles TEL agissent essentiellement par effet indirect.

2. Les effets indirects des RI

Le corps humain étant très riche en eau (80 %), l'interaction des RI avec l'eau est la plus probable. Cette interaction qui porte le nom de radiolyse de l'eau cellulaire joue un rôle majeur. L'ionisation d'une molécule d'eau conduit en effet à deux radicaux libres hautement réactifs ; OH^\bullet (oxydant) et H^\bullet (réducteur), et à la libération d'un électron dit « aqueux » comme représenté sur la figure ci-dessous :

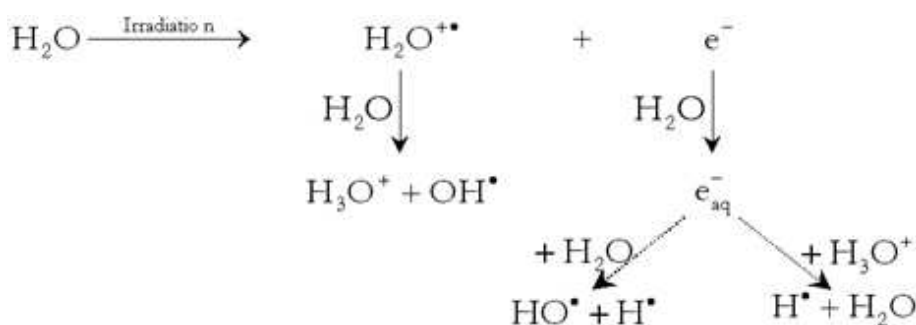


Figure 24 : les différentes étapes de la radiolyse de l'eau.

Ces radicaux libres formés vont ensuite se recombiner entre eux pour donner naissance à des entités telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L'organisme humain peut de lui-même créer des radicaux libres plus connus sous le nom d'espèces réactives de l'oxygène ROS (*Reactive Oxygen Species*), notamment lors du métabolisme respiratoire de la mitochondrie. Une augmentation des ROS dans l'organisme conduit au phénomène dit stress oxydatif.

3. Le stress oxydatif

Les ROS sont des radicaux libres incluant ceux dérivés de l'oxygène (Tableau 7), l'oxygène singulet (^1OO^\bullet) qui est un dérivé très réactif de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) instable contenant un ou plusieurs électrons célibataires (non appariés, noté par un point) [204]. Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé par l'acceptation d'un autre électron ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule [205]. Les radicaux libres vont oxyder les protéines, l'ADN et les membranes cellulaires (attaque des lipides constitutifs par peroxydation lipidique) et perturber ainsi le fonctionnement normal des cellules [206].

Tableau 7 : bilan des différents radicaux libres centrés sur l'oxygène [207]

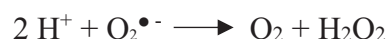
Radicaux libres centrés sur l'oxygène	
$O_2^{\bullet-}$	Radical superoxyde
HO_2^{\bullet}	Radical perhydroxyle
$\bullet OH$	Radical hydroxyle
RO_2^{\bullet}	Radical peroxyde (ex : (HOO^{\bullet}) le radical hydroperoxyde)
RO^{\bullet}	Radical alkoxyde (où R est une chaîne carbonée)

En plus des radicaux oxygénés libres ci-dessus cités, les radicaux libres rassemblent aussi ceux dérivés d'acides gras insaturés comme le radical lipidique peroxydé (LOO^{\bullet}), le peroxydinitrite ($ONOO^{\bullet}$) et le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}). L'origine de la production des ROS peut être endogène (mitochondrie, peroxysome, cytochrome P450, NADPH-oxydase, Xanthine oxydase, réactions immunitaires) ou exogène (RI, UV, métaux, xénobiotiques, pathogènes) [208].

Ainsi, les cellules des êtres aérobies, en état d'oxydoréduction normal, ont une concentration basale en radicaux libres de l'oxygène non nulle. Par ailleurs, au sein de certaines cellules immunitaires, des enzymes interviennent dans la production de radicaux libres pour détruire les micro-organismes, des macromolécules étrangères ou les cellules en décomposition de tissus nécrotiques [209]. La source principale de génération de ROS endogènes dans la cellule est la respiration mitochondriale [204]. En effet, lors de la respiration cellulaire, la réduction de l'oxygène moléculaire par les cytochromes respiratoires peut être réalisée de façon incomplète et s'accompagner ainsi d'une formation parallèle d'espèces extrêmement réactives de l'oxygène. Il faut aussi noter qu'au sein du cytosol, diverses réactions chimiques peuvent produire ces dérivés de l'oxygène. Pour lutter contre un excès de production des ROS, l'organisme dispose d'un arsenal important d'antioxydants comme les superoxydes dismutases (SOD), les glutathions peroxydases (GPx), les catalases (CAT), les métallothionéines (MT), les glutathions S-transférases (GST) etc.

○ *La superoxyde dismutase (SOD)*

La SOD est une enzyme ubiquitaire chez les organismes aérobies. C'est une métalloprotéine à Cu et à Zn présente dans le cytosol des eucaryotes (Cu/Zn SOD), et à Mn dans les mitochondries (Mn SOD). Elle catalyse la dismutation du radical superoxyde selon la réaction [210]:



Les cellules se protègent ainsi des effets toxiques du radical superoxyde, très réactif avec les molécules biologiques, en le convertissant en un composé moins toxique: le peroxyde d'hydrogène. Ce dernier composé demeurant toutefois toxique pour la cellule, d'autres enzymes telles que la catalase et la glutathion peroxydase vont intervenir dans la neutralisation de cette espèce [211].

○ *La catalase (CAT)*

C'est une enzyme héminique. Elle contient donc des atomes de fer au sein de hèmes qui constituent les sites actifs de la protéine. Sa fonction principale est la protection contre les effets toxiques du peroxyde d'hydrogène en catalysant sa décomposition en eau et oxygène:



○ *La glutathion peroxydase (GPx)*

La glutathion peroxydase est une enzyme qui intervient, avec la catalase, dans la destruction du H_2O_2 [212] et aussi dans la neutralisation des hydroperoxydes issus de la peroxydation des acides gras polyinsaturés. Toutefois, il faut noter que la GPx n'est pas spécifique du H_2O_2 , mais plutôt du glutathion Elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène par le glutathion:



Les cellules possèdent également d'autres systèmes de défense contre les ROS tels que des molécules antioxydantes hydrosolubles (glutathion, vitamine C, acide urique) et liposolubles (Vitamine E, caroténoïdes, bilirubine), intervenant tout particulièrement au niveau des membranes cellulaires et des lipoprotéines plasmatiques. Ainsi, les antioxydants ont été définis comme des substances capables de concurrencer d'autres substrats oxydables à des concentrations relativement basses et donc de retarder ou d'empêcher l'oxydation de ces substrats [205]. Lorsque la production des ROS est maîtrisée par les systèmes de défense, la balance anti-oxydants/pro-oxydants est dite en équilibre. Lorsque ces espèces sont produites en trop grande quantité et/ou que les défenses anti-oxydantes sont insuffisantes, une rupture de l'équilibre oxydatif survient et un stress cellulaire se produit appelé "stress oxydant" [213] dont les conséquences pour la cellule peuvent prendre la forme de dommages irréversibles (Figure 25).

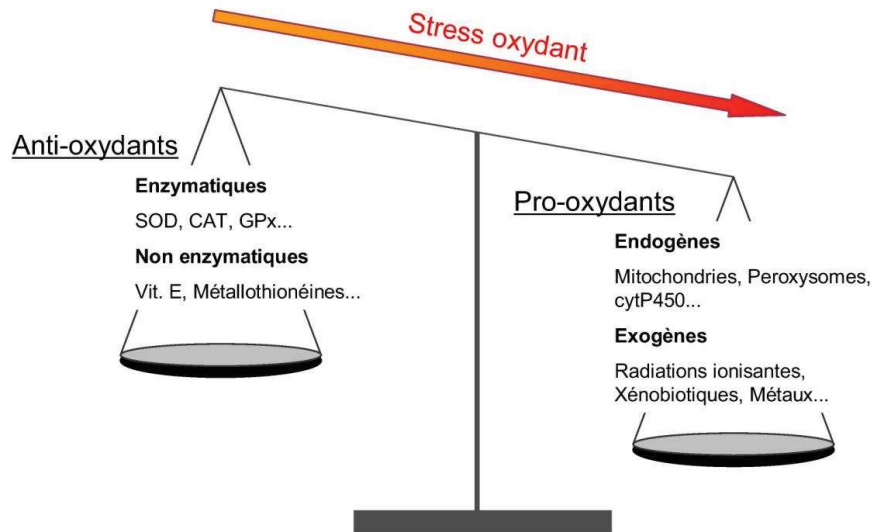


Figure 25 : schéma de la balance anti-oxydants/pro-oxydants représentant un stress oxydant [214].

C. La phase biologique

La durée de cette étape peut aller de quelques secondes à quelques années. Durant cette étape, la cellule tente de réparer les dommages causés par l'énergie transférée par le rayonnement. Les dommages non réparés vont conduire à des transformations morphologiques, des mutations génétiques et à des aberrations chromosomiques ; avec des conséquences visibles à court, moyen ou long terme.

1. Les dommages de l'ADN radio-induits

Il est généralement admis que l'ADN du noyau est impliqué dans la plupart des effets cellulaires majeurs. Des études expérimentales ont montré que la molécule d'ADN représente la cible la plus sensible pour les RI [105]. Les lésions produites au niveau de l'ADN peuvent être de différents types, suivant la zone de l'ADN atteinte comme représentée sur la figure ci-dessous :

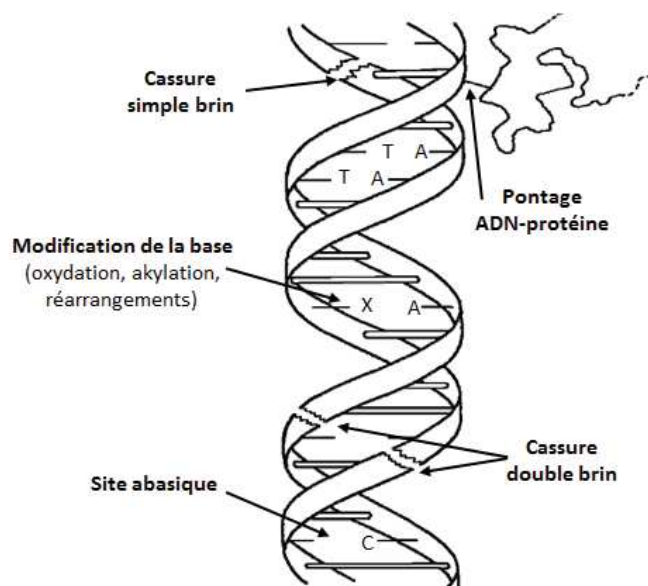


Figure 26 : principales classes de lésions produites au niveau de l'ADN par les rayonnements ionisants [215].

a. Les cassures simples brins (SSB)

Les cassures simples brins de l'ADN (*Single Strand Break*, SSB) sont les lésions radio-induites les plus fréquentes. Elles surviennent dans la majorité des cas, suite à l'arrachement d'un atome d'hydrogène du sucre par le radical OH^\bullet [216]. Leur taux de formation a une relation linéaire à la dose reçue. Elles sont produites en nombre supérieur pour une irradiation à faible TEL comparées à une irradiation de haut TEL. Les systèmes de réparation cellulaire parviennent à les réparer sans grandes difficultés et elles n'ont ainsi aucune incidence sur la survie de la cellule d'après Hoeijmakers [217]. Pour les quantifier, on utilise souvent les techniques du test des comètes et d'éluion alcaline sur membrane de polycarbonate.

b. Les cassures double brin (DSB)

Une cassure double brins de l'ADN (*Double Strand Break*, DSB) est une rupture des deux brins de l'ADN à des distances inférieures à quelques nucléotides. Elle peut être formée par l'action d'un radical OH^\bullet sur un brin avec transfert du radical sur l'autre brin ; et est souvent l'œuvre du dépôt d'énergie d'une seule particule. Une DSB est dite homologue si elle se produit au niveau de la même paire de bases, et hétérologue dans le cas contraire. Les DSBs hétérologues sont les plus fréquentes. Selon Ward qui a développé le concept de *locally multiple damage site* [218], les DSBs sont obligatoirement créés par un dépôt d'énergie élevé. Contrairement aux SSB elles se forment plus rarement (environ 40 par Gy pour une irradiation γ [218]).

Tableau 8 : les dommages de l'ADN radioinduits et leurs spécifications physiques et biologiques [219] : le dépôt d'énergie minimale nécessaire pour la formation des SSB, DSB et BD, leur incidence par Gray de rayons X, leur demi-vie de réparation et la voie de réparation activée par ce type de dommage.

	Dommage de base (BD)	Cassure simple brin (SSB)	Cassure double brin (DSB)
Energie nécessaire	> 1eV/nm ³	> 10 eV/nm ³	> 100 eV/nm ³
Incidence	~ 10000 / Gy	~ 1000 / Gy	~ 40 / Gy
50% de dommages réparés	5 – 10 min	10 – 20 min	> 50 min
Mode de réparation			Suture (NHEJ)
		Recombinaison homologue (HR)	
	Excision-Resynthèse		

Bien que minoritaires de par leur nombre, les DSBs de l'ADN sont très vite apparues comme la lésion majeure influençant le devenir cellulaire. Dans un premier temps, elles induisent un arrêt du cycle cellulaire qui permet soit la réparation, soit la mise en route de mécanismes de mort cellulaire par mort mitotique ou bien par apoptose.

c. Les dommages des bases de l'ADN (BD)

L'interaction des RI avec les bases de l'ADN par effet direct ou indirect, donne lieu à des bases oxydées. Parmi les quatre bases qui constituent l'ADN, la thymine est la plus radiosensible [220]. Mais les autres bases aussi sont sujettes à des altérations sous l'effet des radicaux libres produits par l'irradiation.

Parmi les lésions de l'ADN, les modifications des bases puriques et pyrimidiques sont les plus majoritaires. Elles peuvent également être produites outre par des RI, par de nombreux processus biologiques (respiration, inflammation, exposition à des produits toxiques ect.). Les deux produits majeurs de cette modification chimique des bases sont la 5,6-dihydroxy-5,6-dihydroxythymidine (ThdGly) et la 8-oxo-7,8-dihydro-2''-désoxyguanosine (8-oxodG). ThdGly est la plus abondante [221] mais la 8-oxodG fut la plus étudiée et reste pour cette raison la lésion de référence comme marqueur des lésions oxydatives de l'ADN (stress oxydatif). La réparation des dommages des bases de l'ADN étant relativement aisée, ces deux produits n'auraient aucune conséquence sur la survie cellulaire.

d. Les pontages

On connaît trois types de pontages (*cross links*) radio-induits impliquant l'ADN : ADN-ADN intrabrins, ADN-ADN interbrins et ADN-protéines [222, 223]. Ces derniers se forment par liaison covalente de protéines à l'ADN et impliquent principalement les a.a tyrosine des protéines et les bases pyrimidiques de l'ADN. Quelques articles ont décrit la formation de pontages ADN-ADN par les RI [222, 223].

Ces dommages restent cependant peu étudiés. Cela tient en grande partie à la difficulté technique de leur mise en évidence et de leur quantification. On pourrait cependant penser qu'ils

sont très néfastes pour les cellules, car ils sont susceptibles d'interrompre différents mécanismes vitaux comme la réplication et la transcription. De même on reconnaît aujourd'hui que la réparation des pontages ADN-ADN inter-chaînes est complexe et pourrait représenter pour la cellule un challenge difficile à surmonter. En effet, la réparation de ces lésions requiert la formation d'une DSB de part et d'autre du pontage avant que cette rupture double-chaîne ne soit prise en charge par les systèmes de réparation classique des DSB.

e. Les lésions multiples localisées (locally multiply damaged sites, LMDS)

Le concept de LMDS est issu de la microdosimétrie. Il est basé sur les modèles microdosimétriques décrivant le dépôt d'énergie des électrons en fin de parcours. Dans le modèle théorique en vigueur, les LMDS sont constituées par l'accumulation (*clusters*) de dommages localisés sur un fragment d'ADN de 10 à 20 paires de bases et pouvant contenir la plupart des lésions de l'ADN décrites précédemment : dommages de bases, SSB, DSB. Les LMDS peuvent être induits à partir d'une seule trace de particule en interaction avec l'ADN.

La microdosimétrie prévoit que la fréquence de ce phénomène doit augmenter avec le TEL du rayonnement incident [224, 225]. Ces types de lésions devraient donc être plus observés avec les particules α . Nikjoo *et al* [225] estiment que 40% des lésions ADN formées après une irradiation de faible TEL sont des LMDS contre 95% pour une irradiation de fort TEL. Pour d'autres [226], cette proportion est beaucoup plus petite et ce type de lésions est rare. En raison de leur complexité, les LMDS sont difficilement réparables. Elles sont donc létales en premier lieu, mais elles peuvent aussi être mutagènes et liées à des instabilités génétiques susceptibles d'aboutir à une carcinogénèse.

Outre l'ADN qui est la principale cible des RI, les lipides insaturés de la membrane plasmique et les composants biologiques du cytoplasme peuvent aussi subir des dommages.

2. La membrane cellulaire cible potentielle des RI

L'idée que la membrane pourrait être une cible importante des RI a été suggérée en 1963 par Alper *et al.* [227]. Son rôle dans la réponse cellulaire à l'irradiation peut être expliqué par sa fonction dans de nombreuses voies de signalisation, dont celle de l'apoptose [228]. Ainsi les radicaux libres produits par l'irradiation induisent au niveau de la membrane cellulaire l'hydrolyse de la sphingomyéline via l'activation de la sphingomyélinase acide qui donne naissance aux céramides. La sphingomyéline (SM) est un phospholipide localisé principalement au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique, où elle constitue une barrière semi-perméable pour le milieu extracellulaire. La production précoce de céramide en réponse aux radiations ionisantes résulte principalement de l'activation de la sphingomyélinase (SMase) acide localisée dans les microdomaines de la membrane plasmique appelés radeaux lipidiques, ou « raft », enrichi en cholestérol, SM et protéines de signalisation [229, 230].

Le céramide est un second messenger important impliqué dans la mort par apoptose des cellules par l'activation de la voie c-jun amino-terminal kinase (JNK). Il a été démontré que les lymphoblastes présentant une déficience d'activité de SMase acide ne font pas d'apoptose radio-induit [231]. L'effet protecteur obtenu avec la lidocaïne, un médicament agissant sur les canaux ioniques au niveau de la membrane, suggère également l'implication de la membrane dans l'apoptose radio-induite.

La membrane cellulaire joue également un rôle dans l'emplacement des oncoprotéines telles que Bcl-2 qui peut inhiber la translocation de p53 dans le noyau et peut également influencer la production de céramide. Elle contient aussi les récepteurs des cytokines, telles que celles du facteur de croissance épidermique (EGF) et le facteur de nécrose tumorale (TNF). Ces récepteurs peuvent être activés à la suite d'une irradiation, provoquant ainsi l'activation des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase), du PI3-K (phosphatidyl inositol-3-phosphate kinase) et de MAPK8 (Mitogen-Activated Protein Kinase 8) [232], qui vont ensuite induire une prolifération cellulaire ou la mort.

II. Réponse cellulaire aux rayonnements ionisants

Il est connu depuis longtemps que la progression du cycle cellulaire peut être retardée dans les cellules exposées aux RI [233, 234]. En bref, le cycle cellulaire eucaryote peut être divisé en quatre phases, G1, S, G2 et M, chacun correspondant à une activité cellulaire particulière et à une conformation de l'ADN. La transition à travers ces phases est sous le contrôle des complexes formés par l'association des cyclines avec les cdk (*cyclin-dépendent kinases*, cdk1 ..., cdk9). Le niveau de la plupart de ces complexes oscille au cours du cycle cellulaire, ce qui, conjointement avec les autres protéines précédemment citées, permet de retarder ou d'arrêter la progression du cycle cellulaire à des endroits donnés du cycle, appelés points de contrôle (checkpoints) [235, 236]. Les checkpoints peuvent ainsi être divisés en plusieurs classes [237, 238], parmi lesquels on note ceux concernant la vérification des dommages de l'ADN. A cet égard, des arrêts en G1/S, S et G2/M sont généralement observés dans les cellules exposées aux rayonnements de faible et fort TEL.

Ces arrêts permettent aux cellules soit d'effectuer la réparation de l'ADN et de continuer la progression du cycle ou alors d'engager le processus de mort par apoptose. Le choix de laisser vivre ou de faire mourir la cellule est fonction du niveau de complexité des dommages de l'ADN mais dépend aussi de l'efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN. Ce choix dépend aussi de la proportion relative des oncoprotéines nucléaires telles que Bax, Bcl-2 et Rb [239, 240], de la présence des signaux de survie [241], du type de cellule et de son environnement [242].

Avant d'adopter la réponse cellulaire appropriée, la cellule doit en premier lieu détecter les modifications délétères produites dans la molécule d'ADN (lésions et altérations conformationnelles), les membranes cellulaires ou le cytoplasme et émettre un signal d'alarme. La réponse cellulaire aux dommages de l'ADN responsable de l'arrêt du cycle cellulaire comporte deux voies de signalisation : (i) La voie ATM-Chk2, activée en présence de DSBs, et

(ii) la voie ATR- Chk1 qui répond principalement à la présence de cassures simple brin de l'ADN. Les deux systèmes ciblent les phosphatases Cdc25 ; mais la voie ATM cible aussi p53 pour aboutir au blocage du cycle cellulaire [243] (Figure 27). ATM (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*) et ATR (*ATM and Rad 3-related*) sont des serines-thréonines kinases qui appartiennent à la famille des PIKKs (*phosphoinositide 3-kinase related kinases*).

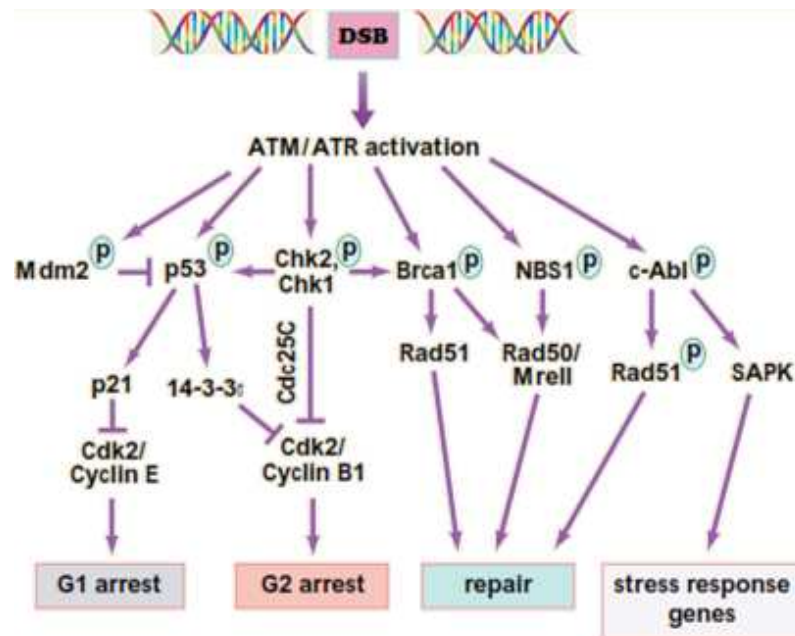


Figure 27 : système de signalisation des dommages de l'ADN suite à une irradiation [244]. Suite à la formation de cassures double brin ATM et ATR sont activés et vont induire l'arrêt du cycle en activant Chk1/2. ATM peut également activer p53 qui active p21. p21 inhibe l'activité de cdk2/cyclin E ce qui conduit à un arrêt en G1. ATM active aussi c-Abl qui va induire l'activation de SAPK entraînant ainsi la régulation transcriptionnelle des gènes de stress.

A. La voie de signalisation ATM-Chk2

ATM est une protéine kinase de 370 kDa codée par le gène ATM muté dans l'ataxie télangiectasie (AT). L'AT est une maladie rare, autosomale et récessive qui affecte une naissance sur 40 000 à 100 000. Elle est caractérisée par une dégénérescence cérébelleuse progressive, des télangiectasies oculaires, un déficit immunitaire, un vieillissement prématuré, une prédisposition aux cancers et une hypersensibilité aux rayonnements ionisants.

ATM joue un rôle dans la détection et la signalisation des cassures double brin de l'ADN. En effet suite à une DSB, le complexe MRN (*Mre11/Rad50/Nbs1*) est recruté au site d'ADN endommagé et recrute à son tour la protéine ATM. ATM est alors activée par autophosphorylation sur la serine (Ser) 1981. Elle phosphoryle ensuite H2AX sur son résidu Ser139 formant ainsi γ -H2AX [245]. Une fois phosphorylée, H2AX recrute au site d'ADN endommagé plusieurs protéines (appelées médiateurs) qui sont phosphorylées par ATM, dont 53BP1, BRAC1, et Chk2. L'activation de la voie ATM-Chk2 inhibe l'activité de Cdc25, une phosphatase à double spécificité (phosphotyrosine et phosphosérine/thréonine) qui, en absence

de dommages d'ADN, active les kinases régulatrices du cycle cellulaire (les Cdk) et contrôle ainsi le déclenchement de l'entrée en mitose et la prolifération (Figure 27).

La phosphorylation de H2AX commence quelques minutes après la production des DSBs par les RI [246] pour atteindre son maximum 10 – 30 minutes après. Les lésions γ -H2AX ne se distribuent pas de façon homogène dans le noyau mais forment des foyers (*foci*). L'intensité globale de phosphorylation de γ -H2AX ainsi que le nombre de foyer sont directement proportionnels à la quantité de DSB produites dans les cellules de mammifères [247]. Quand la réparation est finie, la déphosphorylation de γ -H2AX est nécessaire pour rétablir le statut cellulaire avant le dommage. Pour cette raison, cette protéine est le marqueur le plus utilisé lorsqu'il s'agit de mesurer les cassures double brins de l'ADN. Mais également, pour mesurer les DSBs on peut utiliser comme marqueur la protéine 53BP1.

53BP1 (*p53 binding protein 1*) fait partie des protéines de signalisation des dommages double brin de l'ADN et est nécessaire pour la phosphorylation de plusieurs substrats d'ATM [248]. Comme le γ -H2AX, 53BP1 se relocalise au niveau des sites de DSBs juste après irradiation en formant des foci dont le nombre est proportionnel aux DSBs induits [249]. Le maintien, mais pas le recrutement de 53BP1 dépend de la phosphorylation de H2AX [250].

B. La voie de signalisation ATR-Chk1

ATR et Chk1 sont deux kinases importantes pour le maintien de l'intégrité génomique même en absence d'une source exogène de dommage à l'ADN. Chez l'homme la kinase ATR est essentielle à la survie cellulaire et la mutation de cette protéine est associée au syndrome de Seckel caractérisé, comme les désordres liés à un déficit de réponse aux dommages de l'ADN, par un retard de croissance et une microcéphalie [251]. La voie ATR-Chk1 répond principalement aux cassures simples brins induites suite à un blocage des fourches de réplication et aux lésions produites par les rayons ultraviolets [252]. En effet, l'ADN simple brin est immédiatement recouvert par la protéine RPA (*Replication Protein A*) qui va recruter à son tour ATR via ATRIP (une protéine de régulation qui forme un complexe avec ATR augmentant ainsi l'affinité de cette dernière pour l'ADN et renforçant son activité). ATR est aussi activée par TopBP1 (*DNA topoisomerase II binding protein 1*) [253] et claspine (co-médiateur de Chk1) [254]. Une fois active, ATR active Chk1 en la phosphorylant sur Ser317 et Ser345. ATR phosphoryle aussi d'autres protéines impliquées dans la stabilisation des fourches de réplication et la réparation de l'ADN telles que ATRIP, Rad17, Rad9, TopBP1, Claspine, H2AX, WRN, BLM, BRCA1 et FANCD2 (Figure 27).

Un substrat commun à ATM et ATR est la serine 15 de la protéine p53 [255]. La protéine p53 est une protéine de 393 acides aminés. Elle est impliquée dans plusieurs mécanismes tels que la prolifération, l'arrêt de la croissance et la mort cellulaire. Dans le contexte de réponse cellulaire aux dommages à l'ADN, p53 est activée suite à un stress génotoxique afin d'induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. En effet suite à une lésion de l'ADN, p53 s'accumule et se stabilise pour pouvoir ensuite exercer sa fonction de facteur de transcription. Une des cibles transcriptionnelles de p53 est le gène *p21* qui code pour un

inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines [256]. En effet, p53 en activant la transcription de *p21* induit le blocage de l'activité CDK2-Cycline E et par conséquent, l'accumulation de pRb (retinoblastoma protein) sous sa forme hypophosphorylée [257]. La phosphorylation de pRb est nécessaire pour la dissociation du complexe pRB/E2F et la progression des cellules de la phase G1 vers la phase S [258].

La protéine p21 inactive aussi pRb en induisant sa dégradation par le protéasome, indépendamment de son action inhibitrice sur le complexe CDK2-Cycline E [259]. La partie C-terminale de p21 peut interagir avec le PCNA (proliferating cell nuclear antigen), un acteur nucléaire indispensable à la réplication de l'ADN dans les cellules proliférantes, et inhiber par conséquent la synthèse de l'ADN [258]. C'est grâce à toutes ces fonctions que p21 contribue à l'activation des points de contrôle G1/S et S. De plus, p21 en induisant la dégradation de la cycline B1 participe à l'activation du point de contrôle G2/M suite à l'induction d'un dommage à l'ADN [260, 261].

La protéine p53 est aussi sous le contrôle d'autres protéines telles que ATM, DNA-PK (*DNA-Activated Protein Kinase*) et MAP kinases et sa, stabilité est sous le contrôle des protéines Bcl-2 et MDM2.

C. Les principaux modes de réparation de l'ADN

Une fois la signalisation des dommages radioinduits mise en place, une partie de la réponse cellulaire aux dommages consiste à activer les systèmes de réparation des lésions de l'ADN. La signalisation et la réparation des dommages sont par ailleurs deux phénomènes très liés. Pour réparer les cassures induites, la cellule dispose de plusieurs mécanismes de réparation qui sont spécifiques des dommages. Ces systèmes sont très importants et leur dysfonctionnement entraîne un syndrome souvent caractérisé par une instabilité génétique et une prédisposition au cancer.

Comme le montre la figure 28, les cellules utilisent plusieurs voies pour réparer l'ADN endommagée et ceci en fonction du type de lésion. La réparation choisie peut-être fidèle (*error-free*), c'est à dire qu'elle restaure parfaitement la séquence d'ADN originelle, soit infidèle (*error prone*) c'est à dire qu'une partie de la séquence nucléotidique aura perdu une partie de son information, ou que la nouvelle séquence synthétisée différera de la séquence avant lésion.

La réparation par excision de base (*Base Excision Repair*, BER) cible plus les petites altérations chimiques des bases induites par le métabolisme cellulaire et pouvant entraver ou pas la transcription et la réplication. La BER est donc particulièrement appropriée pour la prévention de la mutagenèse. Cette réparation consiste tout simplement à remplacer les bases modifiées, ou à combler les sites vacants (sites abasiques) par un ou plusieurs nucléotides. La réparation par excision de nucléotides (*Nucleotide Excision Repair*, NER) traite elle, des lésions de distorsion de l'hélice de l'ADN qui interfèrent avec l'appariement des bases et qui entrave généralement la réplication. Contrairement au BER où les lésions traitées sont d'origines endogènes, NER intervient souvent dans le cas de lésions issues de sources exogènes. Une fois la lésion détectée, l'ADN entourant la région affectée est déroulé par le complexe TFIIH, des

endonucléases (ERCC-XPF et XPG) génèrent les coupures simple-brin du site de dommage et finalement l'ADN polymérase comble le site vacant en ajoutant les nucléotides adéquats. Les réparations de type BER et NER ne concernent que les lésions touchant qu'un seul brin de l'ADN.

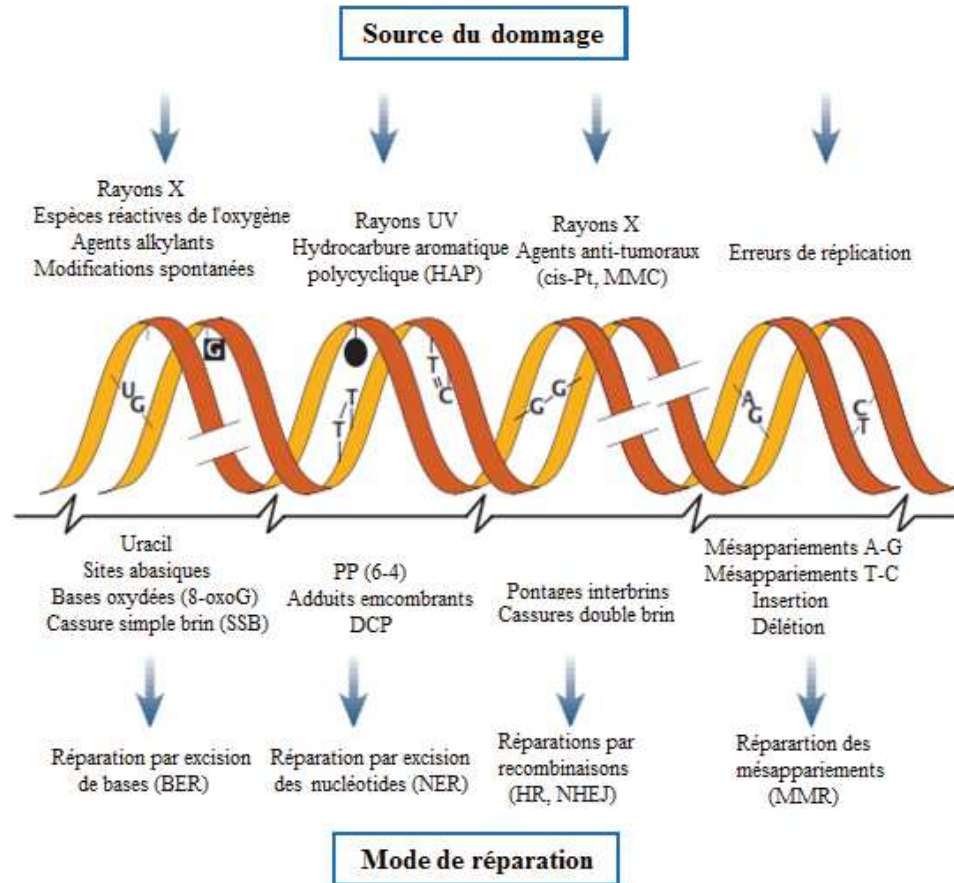


Figure 28 : mécanismes de réparation des dommages de l'ADN [217]. HAP : hydrocarbures aromatiques polynucléés ; cis-Pt : cisplatine ; MMC : mitomycine C ; 8-oxoG : 8-oxoguanine ; PP(6-4) : photoproduits (6-4) ; DCP : dimères cyclobutyliques de pyrimidines.

Du fait de l'importance que représentent les DSBs dans la létalité de la cellule, nous nous focaliserons, dans cette introduction sur les voies de réparations concernant ces types de cassures.

1. Les voies de réparations des cassures doubles brins de l'ADN

Dans les cellules eucaryotes, il existe deux systèmes de réparation des DSB : la recombinaison homologue (HR), qui est une voie majoritaire au cours des phases S et G2 du cycle cellulaire et la *suture* ou (NHEJ : *non-homologous end joining*), qui est prédominante pendant la phase G1. Ces deux mécanismes de réparation sont distincts et complémentaires (Figure 29).

La NHEJ consiste en une suture des deux extrémités de l'ADN ; alors que la HR consiste à remplacer la séquence endommagée par une séquence identique susceptible de s'apparier, prise en amont ou en aval de la région lésée, du chromosome homologue. Tandis que la recombinaison homologue est le mode de réparation majoritaire chez la levure, c'est le NHEJ qui prédomine chez les cellules humaines.

a. La recombinaison homologue

La recombinaison homologue (*Homologous Recombination*, HR) est une voie de réparation dite fidèle car la séquence d'ADN lésée est resynthétisée à partir de la chromatide sœur ou du chromosome homologue. La HR se produit uniquement dans les phases du cycle cellulaire où la chromatine peut être remaniée pour rapprocher les chromosomes homologues, c'est à dire durant la phase S et en phase G2 [262].

La reconnaissance de la DSB est assurée par le complexe MRN (*Mre11-Rad50-NBS1*). L'activité nucléase de Mre11 [263] effectue la résection des extrémités de la DSB de 5' vers 3'. Les protéines RPA et Rad52 viennent alors se fixer sur les extrémités 3' sortantes afin d'éviter leur dégradation par les exonucléases et pour permettre le recrutement de la protéine Rad51, acteur principal de la RH, en collaboration avec ses paralogues (Rad51B, C, D, XRCC2 et XRCC3) [264].

La protéine Rad51, sous le contrôle de BRCA1 et BRCA2 [265], va ensuite rechercher les séquences homologues sur la chromatide sœur appariée après une invasion de brins par synthèse de nucléofilaments. Les protéines Rad52 et Rad54 participent à ce processus [266]. Cette invasion des brins endommagés dans les brins de la chromatide sœur appariée forme une structure appelée jonction de Holliday. Ces jonctions sont résolues par des endonucléases (résolvases) qui reconnaissent ces structures spécifiques : MUS81 et MMS4 chez l'homme [267]. La séquence d'ADN lésée est alors synthétisée par les polymérases en prenant comme matrice la séquence homologue intacte sur la chromatide sœur. Une fois cette étape achevée, les extrémités franches formées peuvent être liguées.

La réparation par RH est fidèle et permet de conserver l'intégrité du génome. C'est pourquoi des mutations hétérozygotes affectant les gènes BRCA1 et BRCA2 constituent un facteur de prédisposition aux cancers du sein ou des ovaires. En effet si des cellules deviennent homozygotes pour la mutation de ces gènes accompagnée de la perte/diminution de fonction des protéines BRCA1/2, il en résulte une RH inefficace qui peut alors devenir infidèle et être à l'origine de processus de cancérogenèse.

b. La suture : non-homologous end joining (NHEJ)

Le NHEJ est le mécanisme de réparation des DSBs majoritaire dans les cellules humaines. Il peut intervenir tout au long du cycle cellulaire, ce qui n'est pas le cas de la recombinaison homologue. Le NHEJ "classique" ou D-NHEJ (*DNA-PK dependent NHEJ*)

nécessite le complexe DNA-PK (Figure 29). Une voie alternative, le B-NHEJ (*Back-up NHEJ*) a récemment été identifiée [268].

La reconnaissance de la DSB est assurée par le complexe DNA-PK. Celui-ci se compose de l'hétérodimère Ku70/Ku80 et de la protéine DNA-PKcs (*DNA-PK catalytic subunit*). Le complexe recrute la nucléase Artemis, activée par les kinases ATM et DNA-PK [269, 270]. Artemis provoque la résection des oligonucléotides simple-brin situés aux extrémités de la brèche double-brin [271]. Les extrémités résultantes, dites "franches", sont ressoudées par l'ADN ligase IV associée aux protéines XRCC4 et XLF (XRCC4-Like Factor) [272]. La protéine XLF, également appelée Cernunnos, est indispensable au bon fonctionnement du NHEJ en permettant la localisation du complexe XRCC4-Ligase IV aux sites des DSB [273].

L'étape de résection effectuée par Artemis est nécessaire au remodelage précédant la suture mais implique une perte d'information génétique. C'est pourquoi le mécanisme de réparation NHEJ est généralement infidèle.

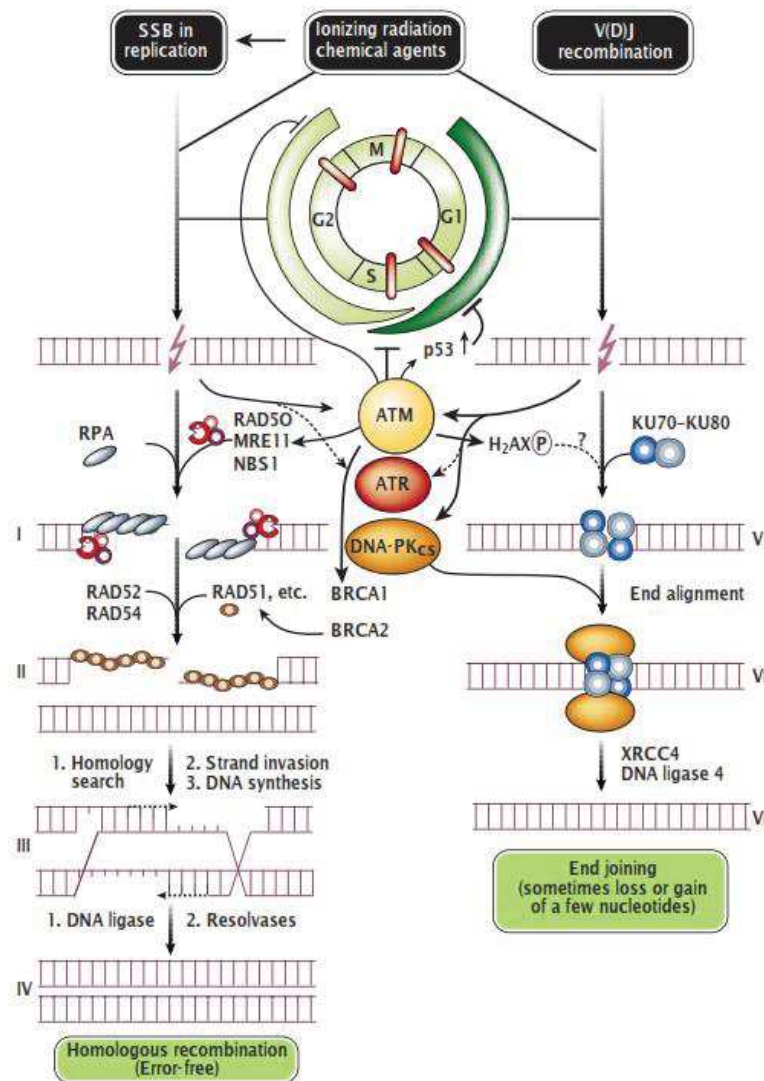


Figure 29 : les différentes voies de réparation des dommages de l'ADN [217]. La cassure double brin est reconnue par le complexe MRN ce qui va générer une extrémité 3' simple brin sortante qui sera immédiatement recouverte par la protéine RPA puis RAD52. (I) La protéine RPA facilite l'assemblage du

filament nucléoprotéique RAD51 et des protéines qui lui sont associées à savoir XRCC2, XRCC3, RAD51B, C et D pour rechercher des régions d'homologie sur le brin homologue. (II) Après identification de la séquence de chromatides sœurs identiques, RAD51 catalyse l'étape d'invasion à partir de l'ADN double brins homologue qui sera utiliser comme modèle pour la réparation. (III) Les jonctions de Holliday formées lors de l'invasion sont résolues par les résolvases. (IV) La HR implique l'action simultanée d'un grand nombre de molécules recrutées par les protéines BRCA1 et BRCA2 qui se retrouvent alors concentrées au point de formation des foci radio-induits. Concernant le système NHEJ, (V-VI) la reconnaissance de la cassure se fait par l'hétérodimère Ku (sous unité régulatrice de la DNA-PK) qui va ensuite recruter et activer la DNA-PKcs (sous unité catalytique de la DNA-PK). (VII) D'autres facteurs (Artemis, XRCC4-LigaseIV) sont ensuite recrutés pour effectuer le processing des extrémités puis la ligation.

2. La réparation des mésappariements (MMR)

La réparation des mésappariements de bases dans l'ADN joue un rôle important dans la stabilité génomique. Elle intervient au cours de la réplication pour corriger des erreurs d'incorporation se produisant au cours de la synthèse de l'ADN. Le mécanisme principal est contrôlé par une famille de gènes conservés chez les eucaryotes ou MSH2 (*MutS protein homologue 2*) joue un rôle central. La réparation fait alors intervenir une excision sur un des brins de plusieurs centaines de nucléotides.

Il a été mis en évidence l'implication d'une déficience de cette voie de réparation dans l'étiologie de cancers héréditaires (HNPCC : *Hereditary Non Polyposis Colon Cancer*) [274], d'où l'intérêt d'une étude approfondie des mécanismes sous-jacents de cette voie de réparation ainsi que la recherche de corrélations possibles entre l'apparition de mutations dans des gènes du MMR et l'induction de cancers [275].

Le système de réparation des mésappariements de l'ADN est impliqué dans la cytotoxicité du cisplatine. La déficience de ce système de réparation est reliée à une chimiorésistance des cellules cancéreuses au cisplatine.

3. Les aberrations chromosomiques

Les cassures double brin non réparées ou incorrectement réparées mènent à des délétions ou des aberrations chromosomiques. Les aberrations chromosomiques sont la conséquence d'un certain nombre de lésions individuelles et résultent d'une recombinaison illégitime des cassures de brins, soit sur le même chromosome (échange intrachromosomique) ou entre différent chromosomes (échange interchromosomique) (Figure 30). Elles regroupent des dicentriques, des anneaux centriques et acentriques, des fragments acentriques, des lacunes, des translocations et des inversions [276]. Les aberrations des chromosomes produites dépendent de la situation des cellules dans le cycle cellulaire au moment de l'irradiation. Les cassures produites dans les cellules irradiées au cours de la phase G0/G1, si elles ne sont pas réparées peuvent être répliquées: les deux chromatides sœurs sont affectées, ainsi une aberration chromosomique peut être produite. Si l'irradiation se produit après la réplication de l'ADN, en général une seule chromatide présente une anomalie (aberration chromatidique). Les aberrations chromosomiques ou chromatidiques sont en général létales pour la cellule,

cependant les inversions ou translocations sont plus stables et peuvent persister après plusieurs divisions cellulaires.

Les micronoyaux, qui sont souvent utilisés comme marqueur de l'exposition aux RI, peuvent se produire à partir de fragments acentriques ou à partir des chromosomes entiers. Les aberrations chromosomiques peuvent être observées lors de la première métaphase après irradiation par une coloration au Giemsa ou DAPI mais aussi par la technique d'hybridation in situ fluorescente (FISH).




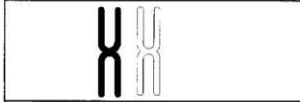


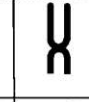

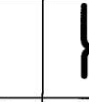


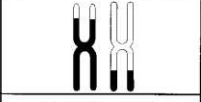
			INTRACHANGES	Chromatid aberrations	
normal	gap	fragment			
				INTERCHANGES	
normal		exchanges			
				INTRACHANGES	Chromosome aberrations
normal	terminal deletion	inversion	interstitial deletion		
				INTERCHANGES	
normal		dicentric and fragments	interchanges		

Figure 30 : aberrations chromosomiques produites par les rayonnements ionisants [105]

III. La mort radiobiologique

En radiobiologie, une cellule est considérée comme vivante, suite à une irradiation, si et seulement si elle a conservé sa capacité de division (aptitude à former des colonies). Ainsi, le terme de « cellule vivante » comprend deux notions : une viabilité (intégrité physique et métabolisme respiratoire actif) et une clonogénicité conservée. La mort clonogénique se définit donc comme la perte irréversible de la capacité de division de la cellule. Elle a surtout un sens dans les thérapies par irradiation où le but est de supprimer la capacité reproductive des cellules tumorales (localement ou à distance). De manière générale, les cassures double brin de l'ADN résiduelles et le taux d'aberrations chromosomiques radio-induites ont été décrites comme corrélées à cette mort clonogénique. Trois types de morts radioinduites ont été répertoriés : la mort mitotique, la nécrose et la mort par apoptose.

La mort mitotique, définie comme la perte abrupte de la capacité à achever avec succès une mitose, survient à la suite de l'accumulation d'aberrations chromosomiques. Elle se caractérise par la formation de cellules géantes et de cellules binucléées, indices d'une cytotidérèse abortive, et surtout par la formation de micronoyaux, entraînant la perte progressive

de matériel génétique. Les cellules qui survivent à une mitose anormale peuvent potentiellement se diviser de manière asymétrique, générant des cellules aneuploïdes qui pourront devenir tumorales. De plus, les cellules qui partent en mitose avec des dommages à l'ADN étant génétiquement instables acquièrent plus facilement des capacités tumorigéniques. La catastrophe mitotique pourrait tuer de telles cellules et ainsi prévenir la formation de cancer. La catastrophe mitotique constitue donc une mort cellulaire primordiale pour le traitement des tumeurs solides par irradiation. Il a aussi été observé qu'une augmentation des catastrophes mitotiques pouvait compenser une apoptose « détériorée », induisant un même taux de mort que pour les cellules présentant une apoptose fonctionnelle [277]. La mort mitotique peut déboucher sur la nécrose ou l'apoptose.

La nécrose est une forme de mort dite passive qui suit le passage des cellules en mitose contenant des cassures de l'ADN et des aberrations chromosomiques. La proportion de cellules contenant des aberrations chromosomiques représente une diminution d'environ 30% après chaque division du fait de la mort cellulaire [278]. La nécrose est caractérisée par une perte précoce de la perméabilité membranaire, dilatation de vésicules cytoplasmiques, et une fragmentation aléatoire de l'ADN. Lorsque des lésions de l'ADN sont mal réparées ou non réparables, la persistance de ces lésions peuvent activer une (des) voie(s) de signalisation différente(s) de celles qui sont impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire et engager irréversiblement ces cellules dans la mort cellulaire par apoptose.

L'apoptose ou « mort programmée » est caractérisée par des modifications morphologiques caractéristiques : la diminution du volume avec arrondissement cellulaire, des excroissances au niveau des membranes cytoplasmiques, la condensation de la chromatine formant plusieurs masses le long de la membrane nucléaire, puis la fragmentation du noyau et la formation des corps apoptotiques. L'activité endonucléotidique ordonnée conduit à la fragmentation oligonucléosomale de l'ADN (fragments de 180 pb). Contrairement à la mort cellulaire par nécrose, la dégradation de l'ADN se produit avant la perte d'intégrité membranaire. L'apoptose implique l'activation de caspases, qui clivent une série de protéines cibles cytoplasmiques et nucléaires à savoir la PARP, les protéines MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) et celle de la structure du cytosquelette (actine, lamine etc.).

Les fortes doses d'irradiation tendent à produire de la nécrose, tandis que les faibles doses provoquent l'apoptose [279]. La mort par apoptose dépend du type cellulaire et est rapidement induite par les rayonnements de haut TEL comparés aux rayonnements de faible TEL [280]. Par exemple, les fibroblastes en culture meurent plus probablement par nécrose alors que les lymphocytes et les cellules myéloïdes meurent par apoptose. L'apoptose peut se produire à différents temps après irradiation:

- *l'apoptose précoce* qui se produit dans les heures qui suivent l'irradiation avant la division cellulaire (mort interphasique),
- *l'apoptose tardive* qui se produit après un arrêt en phase G2 du cycle cellulaire ou plusieurs jours après irradiation.

Pour Radford *et al.* [281] l'apoptose précoce est induite par les cassures de l'ADN, tandis que l'apoptose tardive est due à des lésions non réparées ou mal réparées au niveau des chromosomes.

Les études montrent qu'il existe plusieurs mécanismes d'induction de l'apoptose radio-induite, qui sont distincts et indépendants [283, 284]:

- *la voie de l'ADN nucléaire (apoptose dépendante de p53)*

Les lésions persistantes de l'ADN vont activer la protéine ATM qui a son tour va activer et stabiliser la protéine p53 ce qui augmente sa concentration intranucléaire de manière prolongée. La protéine p53, facteur de transcription, active la transcription de plusieurs gènes dont le gène Bax. Après synthèse dans le cytoplasme et incorporation dans la membrane mitochondriale externe, la protéine Bax peut jouer son rôle de protéine de mort cellulaire. En effet, la mitochondrie contient dans son espace inter-membranaire deux facteurs apoptogènes, le cytochrome c et l'AIF (*Apoptotic Inducing Factor*). La protéine Bcl-2 (protéine de survie cellulaire) permet de maintenir confinée ces deux protéines dans l'espace membranaire et le maintien de la synthèse d'ATP. Lors de l'engagement apoptotique, la protéine Bcl-2 est inactivée, la protéine Bax favorise la libération des deux facteurs apoptogènes dans le cytosol générant une cascade d'activation des caspases. Il peut y avoir de façon concomitante la suppression de synthèse ATP. Les cellules qui entrent en apoptose présentent des modifications structurales et fonctionnelles avant que les noyaux ne manifestent leurs changements apoptotiques caractéristiques.

- *La voie de signalisation du céramide membranaire (apoptose indépendante de p53)*

Les rayonnements ionisants peuvent activer la sphingomyélinase qui hydrolyse la sphingomyéline (phospholipide essentiellement localisé dans le feuillet externe de la membrane) en céramide. Il existe deux voies de production de céramide activées en réponse aux radiations ionisantes: d'une part la production de céramide par hydrolyse de la sphingomyéline par les sphingomyélinases (acide et/ou neutre) activées par l'irradiation, et d'autre part la synthèse *de novo*, par activation de la céramide synthase suite aux lésions de l'ADN radio-induites. Le céramide ainsi généré est capable d'activer un grand nombre de protéines. Les principales cibles identifiées sont : SAPK (*Stress-activated protein kinase*), PKC ζ (*protein kinase C ζ*) et KSR (*Kinase suppressor of Ras*) appartenant à la famille des CAPKs (*ceramide activated protein kinase*). Les protéines KSR membranaires peuvent être phosphorylées, et activer à leur tour la protéine Raf, activant la voie de signalisation de l'apoptose médiée par les MAPKs. Le céramide à forte concentration est capable d'inhiber l'action de la PKC ζ , impliquée dans l'activation de la voie de survie NF- κ B. Le céramide radio-induit active également la voie SAPK/JNK (*stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase*) aboutissant, après une cascade de phosphorylations, à l'activation du facteur nucléaire c-jun, induisant l'expression de facteur pro-apoptotiques tel que le TNF α [284].

CHAPITRE 5

EFFETS NON CIBLES DES RAYONNEMENTS IONISANTS : LES EFFETS BYSTANDER

Pendant longtemps, il a été admis que les effets des RI tels que la mort cellulaire, les aberrations chromosomiques, les lésions de l'ADN, la mutagenèse, et la carcinogenèse provenaient de l'action directe des structures cellulaires, en particulier l'ADN, ou des dommages indirects *via* les ROS produites par la radiolyse de l'eau. Ces effets biologiques sont attribués aux dommages non réparés ou mal réparés de l'ADN des cellules directement irradiées. Cependant au cours des deux dernières décennies, plusieurs études ont décrit le phénomène appelé « effets bystander » défini comme l'induction de lésions dans des cellules non irradiées (aucune traversée de particules chargées) mais voisines des cellules traversées par les RI *via* des signaux transmis par ces dernières [285–287]. Le concept d'effet bystander, qui avait déjà été décrit, a vraiment émergé suite aux travaux de Nagasawa et Little en 1992 [288]. Ils ont rapporté que dans des monocouches de cultures cellulaires exposées à des micro-faisceaux alpha, des échanges de chromatides sœurs étaient observés dans 30 % des cellules, alors que moins de 1 % des cellules étaient traversées par les particules. Depuis lors, de nombreuses études se sont penchées sur l'origine et la nature des effets bystander radio-induits. Les effets bystander comprennent la réduction de la survie clonogénique [289], l'augmentation de l'échange de chromatides sœurs [290], la formation de micronoyaux et l'apoptose [291] et, l'altération de l'expression des gènes et des niveaux d'ARN transcrits [292–294]. Les mécanismes qui sous-tendent les effets bystander sont complexes, et ni les signaux libérés ni les voies de leur transmission ne sont encore complètement connus et compris. L'effet bystander radio-induit a été observé dans plusieurs types de cellules, modèles tissulaires, mais aussi *in vivo*. L'effet abscopal, observé en radiothérapie, est un effet bystander à distance [295].

Contrairement aux effets de l'irradiation directe, une caractéristique essentielle de la réponse bystander est la relation dose-effet (Figure 31). Au lieu d'une réponse accrue avec l'augmentation de la dose d'irradiation, la réponse bystander montre une saturation à des doses relativement faibles (typiquement < à 1 Gy) [320, 328] avec un effet qui atteint un plateau.

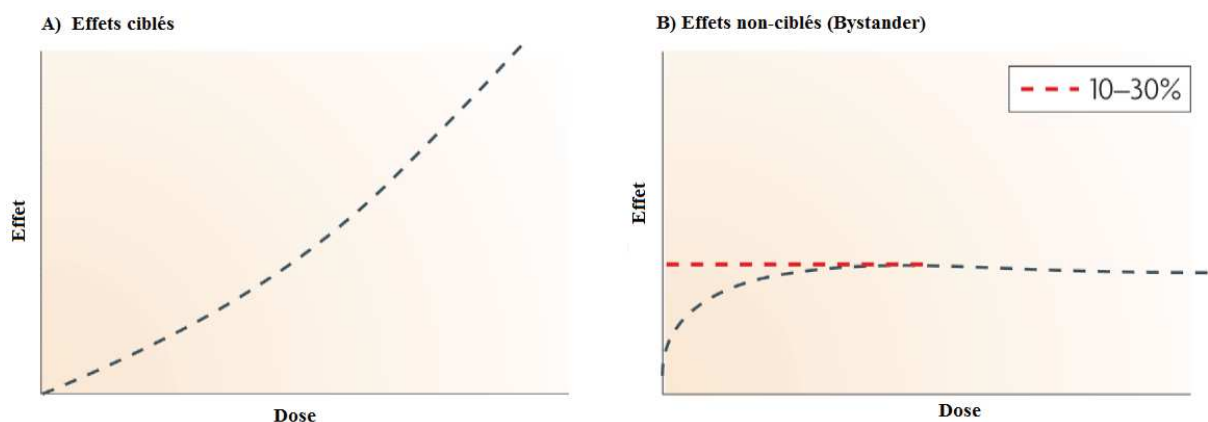


Figure 31: aspects clés de la réponse bystander radio-induite [287]. Courbe dose réponse typique observée lors d'une irradiation (A) et dans le cadre de l'effet bystander (B). Les effets sont présentés, en mettant en évidence la saturation couramment observée dans les réponses bystander.

Cette saturation montre qu'au-dessus d'une certaine dose, aucun effet supplémentaire ne se produit ce qui signifie en pratique, que pour tout critère donné, que toutes les cellules ne répondent pas par effet bystander. Il faut cependant souligner que les effets bystander peuvent avoir un rôle important, même après des doses élevées (> 10 Gy) [297]. Dans de nombreux modèles, après une exposition à faible dose, les effets bystander observés sont presque aussi efficaces que la réponse directe, ce qui suggère qu'au moins dans certaines conditions, ces effets pourraient prédominer dans l'efficacité globale [298].

Les études mettent en avant deux mécanismes pour la transmission du signal des cellules irradiées aux cellules non-irradiées. Le premier consiste en un contact de cellule à cellule souvent assuré par une jonction intercellulaire (*gap junctional intercellular communication, GJIC*) [299] alors que le second est médié par des facteurs solubles sécrétés dans le milieu environnant des cellules irradiées [321, 332, 333].

Les effets bystander peuvent être observés suite à diverses stratégies d'exposition. On note la co-culture de cellules irradiées et non irradiées [302], l'utilisation de très faibles fluences de particules alpha, où la majorité des cellules ne sont pas irradiées [292], l'irradiation de cellules cibles au sein d'une population de cellules en utilisant des microfaisceaux de particules chargées [332, 335, 336], et le transfert de milieu de cellules irradiées vers des cellules non irradiées [289]. L'existence *in vivo* des effets bystander a également été démontrée [305].

Quels que soient les événements déclencheurs, il est clair que certains types de cellules peuvent répondre à l'exposition aux rayonnements en produisant un signal qui peut induire une réponse sur des cellules non irradiées mais, tous les types de cellules n'en sont pas capables. De façon corollaire, tous les types de cellules ne seront pas réceptifs ou ne pourront pas répondre à ces signaux [321, 338, 339].

I. Les mécanismes de transmission des effets bystander

A. Communication cellule à cellule par jonction intercellulaire (GJIC)

Pour les cellules en contact direct (contact physique par exemple dans des boîtes de culture confluentes), la signalisation de l'effet bystander peut se produire par GJIC. Les jonctions gap encore appelées jonctions communicantes sont des canaux protéiques multimériques entre les cellules permettant la transmission de molécules de signalisation [308]. Ces structures permettent de lier directement le cytoplasme de cellules adjacentes. En général, ces pores permettent le transfert de molécules de faible poids moléculaire (<1000 Da) entre les cellules. Ces molécules peuvent être des métabolites, des ions (Ca^{+2}), des nucléotides, des peptides et d'autres messagers secondaires [309].

Pour étudier l'implication des GJIC dans les effets bystander radio-induits, deux méthodes sont souvent utilisées : (i) l'utilisation de produits chimiques tels que l'octanol et le lindane en tant qu'inhibiteurs des jonctions gap, (ii) en utilisant des cellules génétiquement modifiées ne disposant pas de jonctions gap. Ainsi dans des cellules fraîchementensemencées

(pas d'amas de cellules) et prétraitées avec une dose de 40 μM de lindane, on observe une réduction significative de l'effet bystander suite à l'inhibition des GJIC [324, 331].

Bien que ces résultats indiquent un rôle des jonctions gap dans la réponse bystander observée, l'octanol et le lindane sont des inhibiteurs non-spécifiques des jonctions gap, et peuvent avoir des effets très variés sur les autres fonctions ou structures de la cellule, y compris sur la fluidité de la membrane. Par conséquent, pour étudier plus précisément le rôle des GJIC dans la transmission des effets bystander, il est nécessaire d'utiliser des cellules dans lesquelles l'activité de la jonction gap a été supprimée par exemple par suppression du vecteur connexine 43 (encore nommé CX43 ou GJC1). En effet, des études ont montré que l'absence de ce vecteur dans les cellules réduisait fortement ou supprimait la transmission du signal bystander. Ces résultats suggèrent donc que la présence de la connexine 43 dans les cellules est nécessaire pour la transmission du signal bystander par les GJIC [310, 311]. Il est important de noter que la GJIC est seulement disponible en tant qu'option de signalisation dans les cellules normales et qu'elle est généralement régulée à la baisse dans les cellules tumorales où il y a un changement phénotypique clé dans la carcinogenèse [312].

B. Sécrétion de facteurs solubles

La seconde voie par laquelle les réponses bystander sont induites est la sécrétion de facteurs solubles par les cellules irradiées. Ces facteurs peuvent être transférés à travers le milieu de culture cellulaire provenant des cellules irradiées [289]. Ces molécules relarguées ont été largement étudiées [313], et il est admis que leur taille peut varier de 1000 à 10 000 kDa. Mothersill et Seymour sont les premiers à avoir démontré une diminution très significative de l'efficacité de clonage sur des lignées de cellules épithéliales normale et maligne non irradiées ayant reçu le surnageant de culture de cellules irradiées au cobalt 60 [285]. Ces résultats suggèrent que les cellules irradiées sécrètent un facteur cytotoxique dans le milieu de culture, capable de tuer les cellules non irradiées. De plus, le transfert de surnageant de cellules irradiées avec des RI de faibles TEL aux cellules non irradiées induit une augmentation des effets bystander, tels que l'instabilité génomique [314], la mort cellulaire [306, 315] et la transformation néoplasique [316].

Les effets bystander induisent des lésions de l'ADN

Les effets bystander radio-induites impliquent une augmentation de l'instabilité génomique qui se manifeste par une augmentation des fréquences d'échange de chromatides sœurs, de micronoyaux et des aberrations chromosomiques ; toutes ces manifestations étant attribuées aux dommages non réparés ou mal réparés de l'ADN [285, 287, 293, 317]. Nous avons vu que les RI peuvent créer des DSBs dans les cellules irradiées et que la formation de ces DSBs induisent la phosphorylation de l'histone H2AX sous la forme de γ -H2AX. Les foci γ -H2AX une fois formés vont se localiser au niveau des sites marquant ces cassures. Sokolov *et al.* [318] ont également rapporté que des foci γ -H2AX se formaient dans les cellules non irradiées ayant reçu le surnageant de cellules irradiées. Les cellules irradiées et les cellules répondant à l'effet bystander se différencieraient cependant, par le dynamisme d'apparition des

DSBs. En effet les foci γ -H2AX apparaissent pendant ou juste quelques minutes après l'exposition aux RI dans les cellules irradiées, alors que dans les cellules bystander, ils apparaissent seulement après plusieurs heures et en nombre plus restreint [319]. La formation des DSBs ainsi que la voie par laquelle elles sont induites dans les cellules bystander ont également été étudiées en mesurant les foci 53BP1 qui sont des médiateurs induisant la réparation des cassures doubles brins de l'ADN. Lorsque c'est seulement le cytoplasme qui est ciblé, une augmentation de foci 53BP1 est observée à la fois dans les cellules irradiées et les cellules bystander, indépendamment de la dose et du nombre de cellules directement touchées. Egalement lorsque c'est le noyau qui est ciblé, on observe à peu près le même nombre de foci 53BP1 que lors du ciblage cytoplasmique, et également pour les cellules bystander. Cela prouve que le ciblage direct de l'ADN n'est pas nécessaire pour déclencher l'induction de cassures double brin. Lorsqu'on utilise un perturbateur de la membrane cellulaire comme la Filipin, les cellules dont le cytoplasme est touché présentent toujours des foci 53BP1, mais l'effet bystander est totalement supprimé sur les cellules recevant le surnageant (cellules receveuses) [320].

II. Nature des molécules de signalisation et voies impliquées dans la réponse bystander

Comprendre les effets bystander exige l'identification du signal transmis et comment ce signal provoque une réponse dans une cellule non irradiée. Est-ce que le facteur transféré par la jonction gap est le même que celui sécrété dans le surnageant de culture ? Combien de temps après irradiation le signal est-il transmis et quelle est la durée de vie de ce signal ? Alors que la voie de signalisation impliquant la membrane via l'hydrolyse de la sphingomyéline semble être impliquée dans le bystander [321], la voie par laquelle le signal est acheminé vers le noyau reste à déterminer. Comprendre la nature du signal, son expression au cours du temps et la façon dont il exerce son effet dans la cellule bystander est évidemment crucial pour comprendre le mécanisme moléculaire des effets bystander et finalement sa signification biologique.

De nombreuses études ont tenté d'élucider la nature des signaux qui provoquaient les dommages de l'ADN et des effets bystander dans les cellules ; mais les messagers qui transmettent les informations des cellules stressées vers les cellules non ciblées et vice versa ne sont pas encore totalement identifiés.

A. Les signaux intercellulaires

1. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces nitrées de l'oxygène (RNS)

Les premières observations ont suggéré que certains radicaux à longue durée de vie induits par les RI pourraient être exportés vers les cellules voisines où ils induisent des dommages de l'ADN. L'augmentation de l'instabilité génomique, des micronoyaux, des mutations, des aberrations chromosomiques ou la diminution de la survie observée chez les cellules receveuses pourraient résulter de ce dommage oxydatif secondaire de l'ADN. De nombreuses expériences utilisant des inhibiteurs de ROS et des espèces nitrées (RNS) semblent

confirmer ce scénario. L'acide ascorbique (c-PTIO) par exemple, un inhibiteur des radicaux à longue durée de vie, a supprimé l'induction de micronoyaux dans les fibroblastes humains co-incubés avec des cellules irradiées aux rayons X [322]. Cependant, d'autres expériences suggèrent que d'autres types de signaux doivent également prendre part au phénomène de bystander car, même si les dommages de l'ADN sont diminués en présence des inhibiteurs de ROS, il ne s'en suit pas toujours une réduction de l'apoptose ou une augmentation de la survie cellulaire [323, 324].

Un grand nombre d'études soutiennent l'importance de l'oxyde nitrique (NO) dans les voies intercellulaires de transduction du signal initiées par les RI. Shao *et al.* [325] ont montré que l'oxyde nitrique et le TGF β 1 peuvent être tous deux impliqués dans la signalisation des effets bystander radio-induits sur des cellules de glioblastome irradiées avec des ions d'hélium puis co-cultivées avec des cellules non irradiées en présence d'un inhibiteur de l'oxyde nitrique synthétase ou d'un anticorps anti-TGF β 1. De plus, ils ont remarqué que la stimulation de la libération de NO augmente la production de TGF β 1 et inversement que la stimulation de TGF β 1 entraîne l'accumulation de l'oxyde nitrique synthase (iNOS), ce qui démontre une rétroaction positive entre ces deux voies. TGF β 1 sécrétée par les cellules irradiées peut également activer la NADPH oxydase, qui est située au niveau de la membrane cellulaire et qui est responsable de la persistance de production des ROS et de NO [326].

2. Les cytokines

Les cytokines sont des polypeptides solubles, produites par une grande variété de cellules soit de manière constitutive soit après induction [327]. Elles sont d'une importance capitale pour la signalisation entre les cellules et plusieurs études montrent qu'elles constituent une composante humorale de la réponse des cellules à l'exposition aux rayonnements. En radiothérapie, de nombreuses études ont démontré l'importance de ces molécules dans la genèse et la perpétuation des complications radio-induites [328]. Les cytokines sont regroupées en plusieurs sous-catégories à savoir : (1) les interleukines (*inter-leukocyte communication* ; IL) allant de IL1 à IL30 jouent un rôle de médiateur entre les cellules du système immunitaire ; (2) les interférons (IFN) appartiennent au système immunitaire inné et empêchent l'infection des cellules par les virus, IFN- α , IFN- β et IFN- γ étant les plus connus; (3) les facteurs de nécrose tumorale (TNF) ; (4) les facteurs de croissance de transformation (TGF) ; (5) les chimiokines et (6) les facteurs de croissance hématopoïétique (CSF).

Tout comme les RI, les cytokines pro-inflammatoires sont capables de générer des ROS et des RNS [329]. Certaines cytokines et facteurs de croissance, y compris le TNF- α [330] et l'EGFR, produisent des ROS permettant ainsi d'activer les voies de signalisation. A l'inverse, les cytokines anti-inflammatoires, tels que le TGF- β , l'IL-10 et l'IL-4, ont tendance à inhiber les effets médiés par les ROS / RNS et présentent des propriétés anti-oxydantes [332–334], bien que cela peut varier avec le type de cellule et des circonstances.

3. Signalisation du calcium

Le calcium est une molécule de signalisation importante. En effet, les changements de la concentration intracellulaire du calcium régulent les fonctions cellulaires telles que la sécrétion, l'activation des enzymes et la régulation du cycle cellulaire et peuvent conduire à l'apoptose [335, 336]. Le Ca^{2+} régule également la plupart des systèmes impliqués dans la formation des ROS. En effet, les interactions entre les ROS et la signalisation du calcium peuvent être considérées comme bidirectionnelle : l'augmentation de la concentration intracellulaire du Ca^{2+} stimule l'activité de la chaîne respiratoire de la mitochondrie conduisant à la production de ROS. Ces ROS vont ensuite cibler le réticulum endoplasmique (réservoir de stockage du Ca^{2+}) et provoquer la libération du Ca^{2+} . L'augmentation intracellulaire des ROS et du calcium va produire l'ouverture des pores de la mitochondrie libérant ainsi des facteurs pro-apoptotiques.

Mothersill *et al.* ont largement étudié la réduction de la survie radio-induite dans les cellules bystander et ont trouvé que l'apoptose est le mode de mort majeur de ces cellules non irradiées [289, 336–338]. Ils ont remarqué que les ROS étaient impliquées dans la diminution du potentiel membranaire de la mitochondrie et du niveau intracellulaire du Ca^{2+} dans ces cellules. Par ailleurs, la chélation du calcium et le blocage des canaux Ca^{2+} voltage-dépendant conduit à la suppression de l'induction de l'apoptose dans les cellules bystander [336], suggérant que la signalisation du calcium médie le signal bystander. Plus récemment, Shao *et al.* [339] ont également montré que l'irradiation par des particules α induit une réponse bystander *via* les flux calciques.

La figure 32 résume les principales molécules identifiées comme impliquées dans les effets bystander.

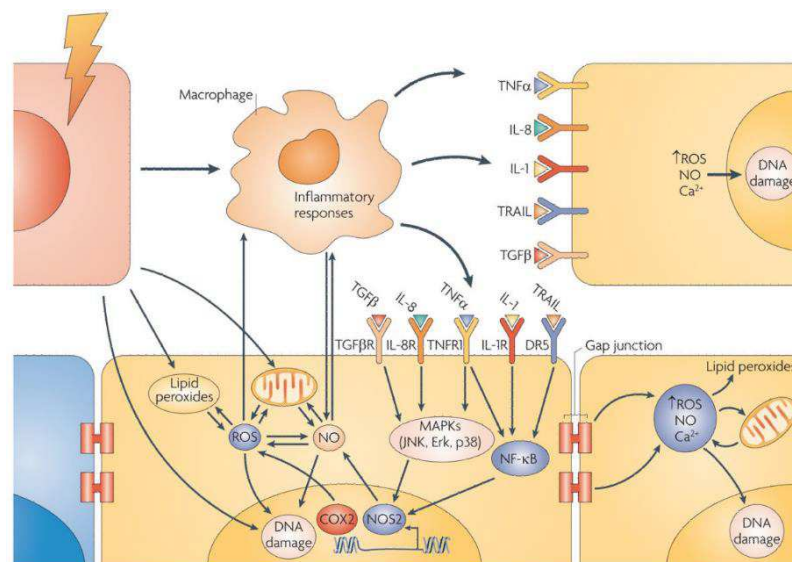


Figure 32 : voies clés affectant les signaux bystander [287]. Les cellules répondent aux effets directs des RI (cellules en rouge) en produisant des effets bystander par deux voies principales. Une implique les jonctions gap et la seconde, la libération de signaux tels que les cytokines, le Ca^{2+} et les ROS dans la matrice extracellulaire. Toutes les cellules ne réagissent (par exemple, la cellule bleue). In vivo, les macrophages peuvent être des médiateurs importants, qui en réponse aux lésions tissulaires induites par l'irradiation libèrent des signaux bystander qui affectent les cellules non irradiées (cellules jaunes). Certaines des voies et

mécanismes clés sont maintenant élucidés : les cytokines et les ROS transmettent le stress aux cellules non irradiées en activant chez ces dernières les MAPKs et le NF- κ B.

B. Les signaux intracellulaires

1. Les Mitogen-activated protein kinase (MAPK)

Les cellules répondent aux changements des propriétés physiques et chimiques de leur environnement en modifiant plusieurs fonctions cellulaires telle que la survie, le potentiel prolifératif, le métabolisme, l'interaction avec d'autres cellules et de nombreux processus impliqués dans l'homéostasie et la santé de l'organisme. Pour ce faire, elles activent les MAPKs qui sont des Sérine/Thréonine protéines kinases. Ces kinases sont des composants de la signalisation essentiels pour convertir les signaux extracellulaires en réponses cellulaires. La superfamille des MAPKs comprend ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases*) activée par des facteurs de croissance et des mitogènes, JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) et p38 toutes deux activées en réponse à des stress génotoxiques ou des cytokines pro-inflammatoires, ce qui a conduit à les appeler SAPK (*stress-activated protein kinase*).

L'exposition des cellules aux RI et à d'autres stress toxiques induit l'activation compensatoire simultanée des MAPKs. En effet l'irradiation de la membrane plasmique est connue pour activer les voies MAPKs [340]. Il existe des preuves que l'effet bystander induit l'activation rapide en série des protéines NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), Raf-1, ERK1/2, JNK, p38, et leurs effecteurs en aval à savoir AP1 (*activator protein 1*), ELK-1, p90RSK, et ATF-2 (*activating transcription factor 2*) [341].

De plus, des preuves existent que les protéines TGF- α [342] et TNF- α [343] sécrétées par les cellules irradiées activent ERK 1/2 dans des cellules bystander. Le TNF- α sécrétée par les cellules irradiées transmet le signal bystander par activation de MEK1/2 (*MAP/ERK kinase 1/2*), ERK1/2 et par la cyclo-oxygénase 2 (*COX-2*). ERK1/2 et COX-2 sont toutes deux responsables de la diminution de la survie induit par l'effet bystander et de la mutagenèse [344]. TGF- β 1 sécrétée par les cellules irradiées, induit sur les cellules bystander des foci γ -H2AX [345] et module l'expression des gènes intervenant dans le cycle cellulaire [346]. Les effets bystander pourraient également induire une régulation à la baisse de l'IGFBP-3 (*insulin-like growth factor binding protein 3*) conduisant ainsi à une mutagenèse bystander induit [344].

2. Les radeaux lipidiques

Les radeaux lipidiques sont des domaines enrichis en céramide retrouvés dans la membrane cellulaire et qui sont produit suite à l'hydrolyse de la sphingomyéline en céramide après activation de la sphingomyélinase acide (A-SMase) par les ROS [347].

Des études ont démontré que les radeaux lipidiques sont capables d'induire par effets bystander des mutations [321], des échanges de chromatide sœurs [321], la formation de micronoyaux [348], la production de NO [348] et la formation de foci γ -H2AX [345]. Il est à

noter que, les protéines NAD(P)H oxydase et la connexine (Cx) qui sont toutes deux impliquées dans les effets bystander, sont localisées dans les radeaux lipidiques.

3. Les points de contrôle des dommages ADN

La protéine suppresseur de tumeur p53 joue un rôle central dans la réponse aux dommages de l'ADN après une exposition aux RI [349]. Plusieurs études montrent que l'effet bystander pouvait induire l'expression de p53 [292, 311, 341, 350] phosphorylée sur la sérine 15 et de la protéine p21^{Waf1} [292, 311, 341, 350] conduisant ainsi à un arrêt transitoire mais pas permanent du cycle en phase G1 [341]. Fait particulièrement important, on observe après irradiation à de faibles fluences de particule α de cultures cellulaires, une hausse de l'expression p21^{Waf1} sur les amas cellulaires se trouvant dans le voisinage des cellules irradiées [292, 341, 350]. En accord avec cela, une baisse de l'expression des gènes CDC2, Cycline B1 et de RAD51 bystander induit a été rapportée [292].

III. Les effets bystander *in vivo*

Les effets bystander ont été observés principalement dans des conditions *in vitro* qui ne reflètent pas exactement les conditions de vie des cellules. Étant donné que les effets bystander impliquent des interactions physiques de cellule à cellule, la pertinence de telles méthodes de manipulations reste discutable. L'intérêt croissant d'études *in vivo* découle du fait que les cellules réagissent différemment dans un organisme vivant, en communiquant en permanence avec les tissus et les fluides corporels environnants. En comparaison avec le nombre d'études *in vitro*, il y a relativement peu d'études sur les effets bystander *in vivo* (tableau 9).

Tableau 9 : études *in vivo* des effets bystander [352]

Observations biologiques	Système cellulaire	Type de rayonnements	Référence
Aberrations chromosomiques	Ovaires et foie d'hamster chinois	²³⁹ PuO ₂ ; particules α	[353–355]
	Mélange cellules irradiées et non irradiées de moelle osseuse de souris	Neutrons	[356]
Formation des micronoyaux	Poumons de rat	Rayons γ	[357], [358]
La mobilisation du calcium; taux de phosphatase alcaline; développement embryonnaire	Incisives de rat, Thyroïde de rat, Abdomen de rat	Rayons X	[359], [360]
Capacité régénérative	Ver de terre	Rayons X	[361]
Activation des macrophages ; respirations métabolique ; activation NO ; infiltration par les neutrophiles	Souris TP53 ^{-/-}	Rayons γ	[362]
Croissance tumorale	Mélange de cellules LS174T d'adénocarcinome du côlon humain irradiées et non irradiées	Electrons Auger	[363]
	Souris C57BL/6	Rayons γ	[364]

La première étude *in vivo* relatant les effets bystander a été réalisée en 1974 par Brooks *et al.* [353]. Ils ont démontré en irradiant le foie d'hamsters chinois avec des émetteurs de particules α que toutes les cellules hépatiques présentaient des dommages chromosomiques en grand nombre bien que seule une petite fraction du foie ait été irradiée.

Waston *et al.* [356] ont également pu mettre en évidence l'existence de l'effet bystander *in vivo* en utilisant un procédé de transplantation de moelle osseuse dans laquelle un mélange de cellules irradiées et non irradiées (les deux types de cellules sont distinguées par des marqueurs cytogénétiques) est transplanté sur des souris femelles. Des instabilités chromosomiques ont alors été observées dans la descendance des cellules non irradiées. En utilisant un émetteur d'électron Auger, Xue *et al.* [365] ont évalué sur des souris portant des xénogreffes sous-cutanées, la capacité du 5-¹²⁵I iodo-2'-deoxyuridine (¹²⁵I-UdR) ciblant les cellules tumorales à induire des dommages sur les cellules voisines non irradiées. Ils ont ainsi observé après injection de mélange de cellules d'adénocarcinomes du colon traitées et non traitées à l'¹²⁵IUdR, un retard de croissance de la tumeur des cellules non ciblées avec ¹²⁵IUdR.

Belyakov *et al.* [366] ont pu démontrer l'existence d'effets bystander dans des tissus humains normaux en 3D. Bien qu'il ne s'agisse pas réellement d'un test *in vivo*, le modèle utilisé qui est un système de tissu humain reconstruit, mime les conditions de vie réelle des cellules. Ils ont ainsi pu montrer l'induction de micronoyaux et d'apoptose sur des cellules non irradiées se trouvant jusqu'à 1 mm de distance des cellules irradiées par des microfaisceaux de particules chargées. Un nombre moyen de micronoyaux 1,7 fois plus grand et de cellules apoptotiques 2,8 fois supérieurs ont été observés dans ces cellules non irradiées comparés aux tissus contrôles.

D'autres phénomènes induits *in vivo* par les effets bystander ont également été relatés (tableau 9). Chez l'Homme la mise en évidence des effets bystander est principalement observée dans le cadre de la radiothérapie externe et est plutôt connu sous le terme d'effets abscopaux [363, 367]. Il convient de souligner que l'effet abscopal n'est pas équivalent à l'effet bystander [295] mais se réfère aux réponses observées dans des tissus à distance ou au contact de tissus irradiés. Ces réponses seraient médiées par la réponse immunitaire.

IV. Relation entre les effets bystander et les autres effets non ciblés

L'instabilité génomique radio-induite, les effets abscopaux, les facteurs clastogéniques induits et les effets héréditaires peuvent être produits par les effets non ciblés des rayonnements ionisants [368].

L'instabilité génomique est l'ensemble des conséquences néfastes (mort différée ou mutations létales, anomalie chromosomique et la mutagenèse) observées dans la descendance des cellules ayant survécu à une irradiation. L'augmentation chronique de la production des ROS dans la descendance est considérée comme l'un des mécanismes responsables de la perpétuation de l'instabilité génomique [369]. Le lien entre l'instabilité génomique et les effets bystander a été largement étudié. Ces deux phénomènes peuvent s'observer sous la même forme à savoir : induction de mutation [370], mort cellulaire retardée [371], réarrangement chromosomique et formation de micronoyaux [371]. Il a été démontré que les cellules issues de

la descendance de cellules irradiées chromosomiquement instables, secrètent des facteurs solubles responsables de la mort et de l'induction d'instabilité chromosomique sur des cellules voisines [300]. Ces facteurs sécrétés induisent la formation des ROS, une augmentation de la concentration intracellulaire du Ca^{2+} , et une diminution du potentiel membranaire de la mitochondrie sur les cellules voisines (cellules bystander) [372]. Tous ces éléments mettent en évidence de façon claire la relation entre les effets bystander et l'instabilité génomique, avec pour mécanisme commun un stress oxydatif persistant observé.

Les effets abscopaux du latin « *ab* » qui signifie loin de et « *scopos* » qui veut dire cible, se définissent comme étant des réponses significatives se produisant dans des tissus totalement séparés du volume tissulaire irradié. La littérature sur les effets abscopaux [373, 374] est généralement de nature descriptive et fournit peu ou pas d'interprétation en termes de mécanisme expliquant cette réponse. Mais si les effets abscopaux se produisent effectivement [357, 364], alors ils doivent impliquer un facteur sécrété (cytokines par exemple) et par conséquent des réponses de type bystander.

Après l'irradiation du corps entier, le plasma sanguin de certains individus / animaux peut contenir des facteurs pouvant causer des dommages chromosomiques, d'où le nom de facteurs clastogéniques [375, 376]. De tels dommages non-ciblée indiquent la persistance de facteurs solubles induits par les RI, capable de provoquer des réarrangements cytogénétiques dans les cellules non irradiées. A ce titre, les facteurs clastogéniques fournissent peut-être la meilleure preuve de sécrétion de facteurs solubles après une exposition aux RI. Ces facteurs entraînent des effets retardés, dans certains cas ils sont toujours présents dans le sang 30 ans après l'exposition aux rayonnements [377].

Pour résumer, on peut donc affirmer que les effets bystander incluent donc l'instabilité génomique, les effets abscopaux et les facteurs clastogéniques.

V. Conséquences des effets bystander pour la thérapie

Les RI sont utilisés depuis plus d'un siècle en clinique à des fins diagnostique et thérapeutique. Ainsi, les effets bystander seraient bénéfiques pour la radiothérapie, puisque des cellules tumorales pourraient être éliminées sans être ciblées. En particulier, ce serait le cas de la thérapie utilisant des radionucléides [378], la thérapie de capture de neutrons par le bore [379] et la curiethérapie où les effets bystander coexistent avec les effets ciblés des RI dans le volume tumoral traité. De plus, en raison du rôle essentiel des GJIC dans la médiation de l'effet bystander, dans les situations où les cellules irradiées et non irradiées sont physiquement en contact, il pourrait être très intéressant d'améliorer le réseau des GJIC entre les cellules tumorales. Une stratégie pour augmenter les GJIC peut consister en l'administration de produits chimiques connus pour renforcer les jonctions communicantes des cellules tumorales (par exemple, les rétinoïdes, les caroténoïdes, composants du thé vert) [380]. Une autre méthode serait l'introduction de gènes Cx dans les tumeurs ayant une déficience en GJIC ; gène également connu comme restaurant les GJIC mais aussi pour réduire la croissance cellulaire et

la tumorigénicité [380]. Il convient également de noter que l'absence de GJIC entre les cellules normales et tumorales [381] permet la destruction sélective des cellules tumorales.

Néanmoins, outre leur aspect bénéfique pour la radiothérapie, les effets bystander peuvent s'avérer néfastes pour les tissus sains. En effet, les cellules ciblées par une irradiation à faible débit de dose produisent des signaux délétères sublétaux pour les cellules avoisinantes non irradiées contribuant ainsi à la déstabilisation de leur génome [382]. Ce processus est incriminé dans le développement des cancers secondaires, mis en évidence dans des modèles expérimentaux *in vivo* [383]. Une autre étude *in vitro* suggérerait que, pour les particules α (fort débit de dose), le potentiel de transformation oncogénique induit par les effets bystander ne serait important que pour des doses inférieures à 0,2 Gy [384]. Ainsi, puisque la radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité (RCMI), dont l'utilisation est croissante, concerne de grands volumes de cellules irradiées à de faibles doses, il a pu être évoqué un risque accru de cancer secondaire [385], bien que les mécanismes de ces effets non ciblés ne soient pas encore clairement compris.

Au final, l'effet bystander pourrait être illustré comme un effet de proximité de cellule à cellule dans un rayon inférieur à quelques millimètres des cellules irradiées de façon centripète ou au sein d'une zone irradiée de façon hétérogène. Cet effet semble prévalent dans le contexte de faibles doses de l'ordre de quelques dixièmes de Gray.

OBJECTIF DE LA THESE

La propagation d'une tumeur dans la cavité péritonéale est un facteur défavorable et un défi thérapeutique pour une variété de tumeurs malignes. Le traitement des carcinomes péritonéaux d'origine ovarienne par exemple a montré un taux d'échec élevé malgré la combinaison d'une chirurgie réductrice et d'une chimiothérapie adjuvante. L'utilisation de la radioimmunothérapie comme nouvelle approche dans ce type de maladie a permis de réduire un taux élevé de rechute [386–388]. Souvent, le radionucléide utilisé lors de cette thérapie est un émetteur de particule β^- . Ce type d'émetteur produit une irradiation non spécifique « feu croisé » non négligeable qui fait que pour se préserver d'une atteinte de la moelle hématopoïétique, la dose délivrée au cours de ces traitements se révèle finalement insuffisante pour obtenir une efficacité optimale [181]. L'utilisation des radionucléides de haut TEL (émetteurs de particules α ou d'électrons Auger) pourrait constituer une alternative permettant d'augmenter l'efficacité de la RIT dans la prise en charge thérapeutique des carcinomes péritonéaux.

La RIT agit souvent selon deux mécanismes : les effets ciblés qui regroupent les effets biologiques observés dans les cellules ou tissus traversés par les rayonnements ionisants et les effets non ciblés (ou bystander) qui sont observés dans des cellules qui n'ont pas été irradiées mais qui sont au proche voisinage des cellules exposées. Ces deux mécanismes sont connus et ont largement été étudiés dans différentes études notamment en radiothérapie externe. L'étude des effets non ciblés des rayonnements ionisants pourrait ainsi permettre d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie qu'elle soit externe ou vectorisée par le ciblage des cellules tumorales difficilement accessibles.

L'objectif de cette thèse sera donc d'étudier la contribution des effets ciblés et des effets non ciblés en RIT alpha et Auger. La RIT α , sera étudiée *in vitro* et *in vivo*, sur deux modèles de lignées cellulaires à savoir la lignée de carcinome épidermoïde (A-431) ciblée par des AcMs dirigés contre HER2 ou le CEA et préalablement radiomarqués au Plomb 212 ; et la lignée de carcinome ovarien SK-OV-3 ciblée par deux AcMs dirigés contre le récepteur AMHRII (16F12 et 12G4) et préalablement radiomarqués au Bismuth 213. Dans chacun des modèles est également considérée l'efficacité thérapeutique des anticorps nus. *In vitro*, la présence des effets non-ciblés sera évaluée par une méthode de transfert de milieu et s'intéresse à l'existence ou non de relation dose-effets. Les paramètres biologiques retenus sont la survie clonogénique ainsi que la formation de lésions de l'ADN. La dosimétrie est développée à l'échelle cellulaire selon le formalisme du MIRD.

In vivo, la relation dose tissulaire-effets biologiques a également été étudiée. Les effets biologiques concernent la survie et la toxicité mesurées chez les souris traitées mais également l'atteinte tissulaire évaluée par marquages immuno-histochimiques de formation des lésions de l'ADN ou par la mesure de mitoses anormales. L'approche dosimétrique basée sur le MIRD utilise des données de biodistribution conventionnelle ou d'autoradiographie digitale couplées à une détermination voxelisée de facteur *S* tissulaire. Également une nouvelle approche de radiothérapie vectorisée dite « flash » développée par l'équipe [389] sera utilisée dans le cadre de la RIT au ^{213}Bi .

Pour l'étude de la RIT Auger, il s'agit d'une collaboration au travail du Dr S Paillas qui a effectué un stage post-doctoral dans l'équipe. Le modèle utilisé est celui du carcinome colique HCT 116 dont le ciblage est réalisé à l'aide d'anticorps anti-HER2 et anti-CEA couplés à l' ^{125}I .

Matériels et méthodes

MATERIELS

I. Lignées cellulaires

A. Lignées exprimant l'hormone anti-müllérienne

1. SK-OV-3_{AMHRII}

La lignée SK-OV-3 est une lignée d'adénocarcinome humain d'ovaire obtenue auprès de l'ATCC (*American Type Cell Culture Collection*) (Rockville, MD, USA). Elle est cultivée dans un milieu complet : [DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco Laboratories, Cergy-Pontoise, France*) supplémenté en L-glutamine (1%, Gibco, France), en antibiotiques (0,1 UI/ml de pénicilline, 0,1 mg/ml de streptomycine, Gibco, France) et en sérum de veau fœtal décomplémenté (10%)]. Ces cellules ont été transfectées par électroporation avec un plasmide contenant le gène codant pour l'AMHR-II. L'ajout dans le milieu de 0,2 mg/mL de généticine (Gibco, France) va permettre la sélection des cellules possédant l'ADN incorporé codant pour l'AMHR-II. Comme la plupart des lignées ovariennes, ces cellules expriment naturellement le récepteur HER2 (*Human Epidermal Receptor 2*).

2. AN3CA

La lignée AN3CA est une lignée d'adénocarcinome humain issu de l'endomètre et obtenue auprès de l'ATCC. Elle est cultivée dans du MEM (*Modified Eagle Medium, Gibco Laboratories, Cergy-Pontoise, France*) supplémenté en L-glutamine (1%, Gibco, France), en antibiotiques (0,1 UI/ml de pénicilline, 0,1 mg/ml de streptomycine, Gibco, France) et en sérum de veau fœtal décomplémenté (10%). A ce milieu est ajouté des éléments nutritifs à savoir du sérum pyruvate et des acides aminés non essentiels (Gibco, France). Cette lignée exprime naturellement le récepteur de type 2 de l'hormone anti-müllérienne (AMHR-II).

B. Autres lignées cellulaires

Les lignées A-431 et HCT-116 ont longtemps été les modèles d'étude des tumeurs solides de l'équipe. Pour compléter donc les premiers travaux publiés, ces deux lignées seront également utilisées.

1. A-431_{CEA-Luc}

La lignée A-431 est une lignée de carcinome épidermoïde humain de la vulve obtenu auprès de l'ATCC. Elles sont cultivées dans du milieu complet. Le gène codant pour le CEA (*Antigène Carcino-Embryonnaire*) a été transfecté sur cette lignée par la technique de transfection basée sur la propriété des particules lipidiques cationiques FuGENE-6 (Roche diagnostics, Meylan, France). Dans un premier temps, ces particules de FuGENE entrent en contact avec l'ADN et l'incorporent. Les particules ayant intégré l'ADN à transférer sont ensuite mises au contact des cellules. Enfin, elles fusionnent avec la membrane cellulaire ce

qui permet l'entrée de l'ADN dans les cellules. La sélection des clones transfectés par le CEA se fait par ajout de 0,5 mg/ml de généticine® dans le milieu de culture.

Afin de suivre la croissance de ces cellules *in vivo*, les cellules A-431_{CEA} ont par la suite été transfectés par le gène de la luciférase toujours par la technique de transfection au FuGENE-6. Le gène de la luciférase a été introduit dans un plasmide contenant un promoteur fort et le gène de résistance à l'antibiotique de sélection, l'hygromycine (Gibco, France). En résumé la lignée A-431_{CEA-Luc} obtenue est cultivée dans du milieu complet auquel on ajoute 0,5 mg/ml de généticine® et 0,1 mg/ml d'hygromycine.

2. HCT 116

Les cellules HCT 116 de carcinome colique humain ont été obtenues auprès de l'ATCC. Le milieu de culture utilisé est le RPMI (*Roswell Park Memorial Institute medium*, Gibco Laboratories, CergyPontoise, France) supplémenté en L-Glutamine (1%, Gibco, France), antibiotiques (0,1 UI/mL de pénicilline, 0,1 mg/mL de streptomycine, Gibco, France) et en sérum de veau fœtal décomplémenté (10%). Toutes les études réalisées sur cette lignée l'ont été avec les émetteurs d'électrons Auger. Dans ces études, la lignée HCT 116 exprimant la protéine p53 (HCT 116 p53^{+/+}) et la lignée HCT 116 ne l'exprimant pas (p53 déficiente ; HCT 116 p53^{-/-}) ont été fournies par le Dr Vogelstein.

II. Les anticorps monoclonaux

A. Les anticorps spécifiques

1. Le 12G4

L'anticorps 12G4 est une immunoglobuline murine de type IgG1-kappa spécifiquement dirigée contre l'AMHR-II. Cet anticorps a été développé (brevet EP06 291 703.4, 2006) par le Dr Isabelle TEULON. Il est obtenu par hybridation lymphocytaire après immunisation de souris BALB/c avec le domaine extracellulaire recombinant de l'AMHR-II humain [8]. Ses paramètres cinétiques révèlent une forte affinité pour l'AMHR-II humain avec une constante de dissociation sub-nanomolaire (0,86 nM). Le 12G4 est un anticorps internalisant car après sa fixation sur l'AMHR-II, le complexe anticorps/récepteur est internalisé dans la cellule.

2. Le 16F12

Cet anticorps est issu de la même hybridation que l'AcM 12G4 et présente une affinité légèrement plus élevée pour l'AMHR-II-h. Tout comme l'AcM 12G4 il est internalisé dans la cellule après fixation sur son récepteur.

Ces deux anticorps permettront donc de cibler de façon spécifique, les lignées ovariennes SK-OV-3 et AN3CA exprimant toutes les deux le récepteur AMHR-II humain.

3. Le 35A7

Le 35A7 est un anticorps monoclonal murin d'isotype IgG1, dirigé spécifiquement contre la glycoprotéine membranaire CEA qui est impliquée dans l'adhésion cellulaire et exprimée par plusieurs types de cancer. Cet anticorps est purifié au sein du laboratoire sur une résine échangeuse d'ions (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suède) à partir de liquide d'ascite. Lors de la fixation du 35A7 sur le CEA, le complexe n'est pas internalisé.

4. Le trastuzumab

Cet anticorps humanisé est commercialisé par la société Roche sous l'appellation d'Herceptin® [Genentech (Roche), San Francisco, CA, USA]. La forme commerciale est solubilisée dans de l'eau pour préparation injectable afin d'être administrée au patient. L'Herceptin® est purifiée par chromatographie d'exclusion (côlonne Superdex 200, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suède) afin d'éliminer les excipients prévus pour l'usage clinique. Les fractions de trastuzumab recueillies sont stockées à -80°C en tampon de marquage (Tris 0,1M, NaCl 0,15M, pH7). Le trastuzumab est une IgG1-kappa dirigée spécifiquement contre l'antigène internalisant HER2. Il peut donc être utilisé pour cibler les lignées SK-OV-3 et A-431 exprimant toutes les deux, ce récepteur.

5. Le m225

L'AcM murin m225, d'isotype IgG2a, provient de l'hybridome m225 obtenu auprès de l'ATCC. Cet anticorps est dirigé spécifiquement contre le récepteur du facteur de croissance épidermique, l'EGFR (HER1) exprimé par les cellules A-431. Après liaison, l'anticorps monoclonal m225 et le récepteur forment un complexe internalisant.

B. L'anticorps non spécifique

L'AcM murin PX, d'isotype IgG1, a été purifié à partir de cellules de myélome murin P3-X63 [390]. Ne se fixant sur aucun de nos récepteurs cibles (AMHR-II, CEA, HER2 et HER1), cet anticorps a été utilisé comme anticorps non spécifique dans les groupes contrôles lors des différentes RIT. Suite à une rupture de disponibilité de cet anticorps au cours de ma thèse, le rituximab connu pour ne se fixer que sur le CD20 a ainsi été utilisé comme anticorps non spécifique. On retiendra donc que lorsqu'on parlera d'anticorps non spécifique (irrélevant) dans les différentes expérimentations, il s'agira soit du PX ou du rituximab.

III. Le radiopharmaceutique

A. RIT alpha

La RIT α se fera avec des anticorps couplés au ^{212}Pb et au ^{213}Bi . Le ^{212}Pb sera fourni sous forme de générateur *in vivo* $^{224}\text{Ra}/^{212}\text{Pb}$ par la société AREVA Med SAS (Bessines-sur-Gartempe, Haute-Vienne, France) alors que la livraison du ^{213}Bi se sera par l'ITU (*Institut for*

Transuranien Elements, Karlsruhe, Allemagne) sous forme de générateur $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$. Le marquage des différents anticorps à ces deux radionucléides nécessite au préalable de conjuguer les AcMs avec un chélateur pouvant permettre le radiomarquage.

1. Conjugaison des anticorps aux agents bifonctionnels chélatants

Deux agents bifonctionnels chélatants seront utilisés : le TCMC utilisé pour fixer le ^{212}Pb et le DTPA pour le marquage de l'anticorps avec le ^{213}Bi . Quel que soit le chélateur utilisé, le schéma de principe de la conjugaison reste identique même si les solutions utilisées diffèrent en fonction du type de chélateur utilisé.

La conjugaison des chélates aux AcMs est réalisée dans des conditions strictes d'absence de molécules métalliques car elles se fixeraient alors sur les fonctions macrocycliques de ces molécules, qui ne pourront alors plus fixer le radiométal. Le schéma ci-dessous résume les différentes étapes d'une conjugaison :

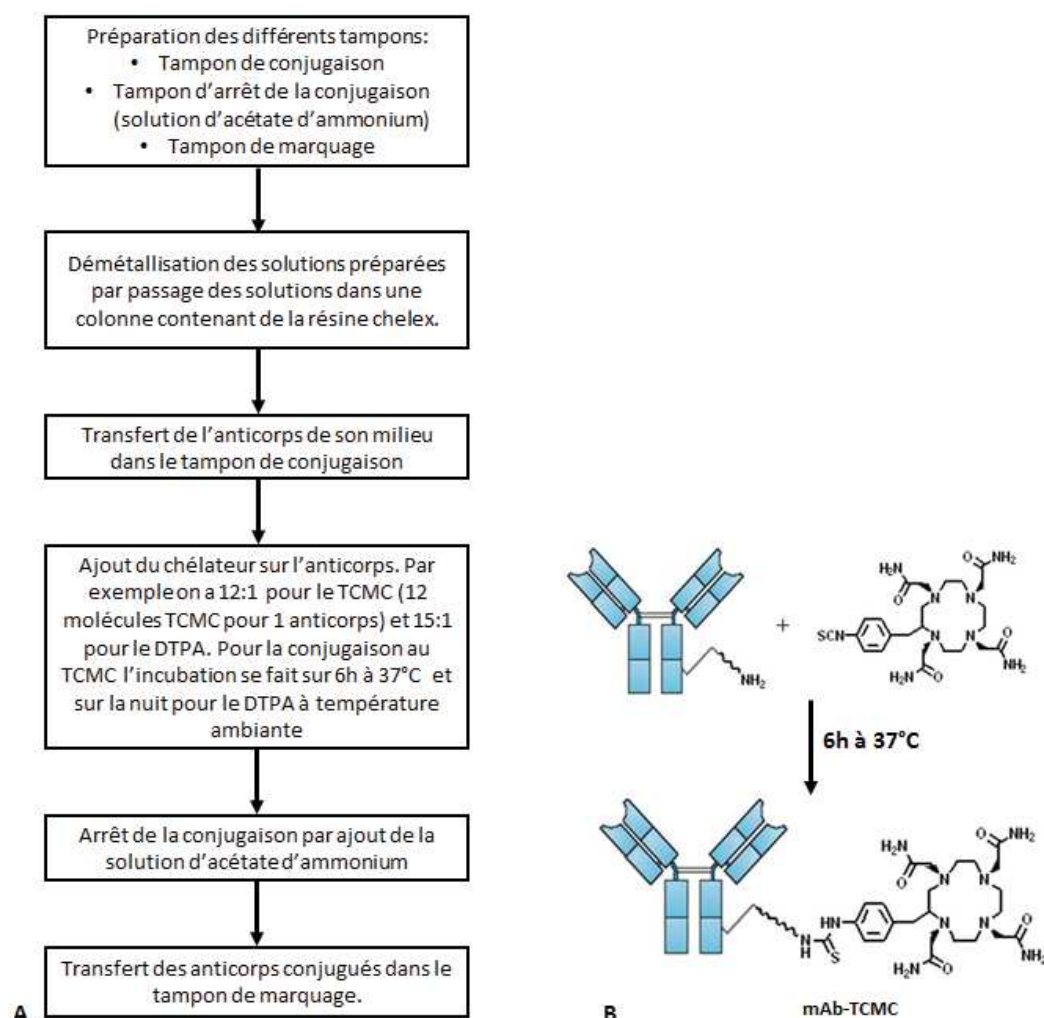


Figure 33 : schéma récapitulatif des différentes étapes de conjugaison d'un anticorps à un agent bifonctionnel chélatant (A). Exemple de conjugaison d'un anticorps monoclonal à une molécule de TCMC (B).

Chacune des différentes étapes de la conjugaison est importante et doit se faire avec une grande attention et minutie. L'échec d'une conjugaison résulte souvent d'une solution avec un pH approximatif ou des solutions encore contaminées par des ions métalliques. Il est donc très important de contrôler et de respecter le pH de chacune des solutions utilisées, tout en travaillant dans des conditions totalement métal free. A la fin de la conjugaison, la concentration finale de l'anticorps conjugué est déterminée par la méthode de Bradford. Il est aussi très important de déterminer après la conjugaison le nombre de chélates par anticorps. Cela se fait en utilisant le test d'Arsenazo [391].

Le test d'Arsenazo est basé sur l'absorbance du complexe Arsenazo (III) / Plomb (II) à 656 nm. L'Arsenazo (III) est une molécule chélatrice capable de fixer une molécule de Plomb (II) par des liaisons de coordinations. L'affinité entre le TCMC / Plomb(II) ou le DTPA / Plomb (II) est supérieure à celle entre l'Arsenazo (III) / Plomb (II). Initialement, toutes les molécules de plomb sont chélatées aux molécules d'Arsenazo (III) mais lors de l'ajout des AcM-TCMC ou AcM-DTPA les molécules de Plomb (II) rompent les complexes formés avec l'Arsenazo et vont se fixer sur les molécules de TCMC/DTPA se trouvant sur les anticorps. Cela va ainsi diminuer le nombre de complexe Arsenazo (III) / Plomb (II) et donc l'absorbance à 656 nm. Connaissant déjà le nombre de complexe Arsenazo (III) / Plomb (II) initial, on peut donc en déduire le nombre de molécules de TCMC ou de DTPA fixé par anticorps [391]. Le nombre de chélates doit être compris entre 5 et 10 pour le DTPA [392] et 2 – 4 pour le TCMC [169].

Il est également très important de vérifier après conjugaison que la capacité de liaison de l'anticorps à son récepteur ne s'est pas dégradée. Cela est aisément vérifié par cytométrie en flux (FACS).

2. Radiomarquage des anticorps au ^{212}Pb

L'éluion du ^{212}Pb est faite en injectant un volume de 4 mL de HCL 2N dans le générateur $^{224}\text{Ra}/^{212}\text{Pb}$. Afin d'éliminer toute trace de composés organiques, l'éluat est déposé sur une plaque chauffante à 150°C pour évaporation. Après évaporation complète, 1,5 mL d'acide HNO_3 8N est ajouté dans le tube puis remis sur la plaque chauffante. Cette opération est répétée 2 fois de plus. A la fin de la dernière évaporation, de l'acide nitrique 0,1 N (300 μL 0,1N HNO_3) est ajouté dans le tube. On obtient du ^{212}Pb de haute pureté dont l'activité peut être mesurée. Le marquage est ensuite lancé en incubant l'anticorps à radiomarquer sur la base de 37MBq/mg pendant 1h à 37°C en présence d'acide ascorbique (50 μL , 220 mg/mL) et d'acétate d'ammonium (30 μL , 5M NH_4OAc). La réaction est ensuite arrêtée en ajoutant de l'EDTA 0,1M (4 μL), et le mélange réactionnel passé sur une colonne PD-10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) afin d'éliminer le ^{212}Pb libre (non fixé sur l'anticorps).

Pour s'assurer de la pureté du marquage, un test d'ITLC (*Instant Thin Layer Chromatography*) est réalisé. Cela permet ainsi d'obtenir le pourcentage de ^{212}Pb fixé ou libre. Le radiomarquage au ^{212}Pb est relativement long (3 – 4 heures). Trois anticorps seront marqués au ^{212}Pb : 35A7-TCMC ; trastuzumab-TCMC et le PX-TCMC.

3. Radiomarquage des anticorps au ^{213}Bi

Le radiomarquage au ^{213}Bi est assez rapide (10 minutes) compte tenu de la demi-vie du ^{213}Bi ($T_{1/2} = 45$ min) afin de limiter la trop grande perte d'activité (en 15 min on a déjà une perte de 21% de l'activité initiale). Le ^{213}Bi est élué en utilisant un mélange de HCl 0,2 M (300 μL) et de NaI 0,2 M (300 μL). L'élué est effectué à un taux de 0,15 mL/min. L'écoulement se fait directement dans un tube rempli de tampon acétate de sodium 4 M (120 μL) et d'une solution à 20% d'acide ascorbique (50 μL). Le pH de l'éluat doit être environs de 5. L'anticorps est ensuite rajouté au mélange à raison de 37MBq/mg et incubé pendant 5 minutes à température ambiante. A la suite de cette courte incubation, le marquage est arrêté par ajout de 10 μL d'une solution à 1,5 mg/mL de DTPA et le mélange est immédiatement passé sur une colonne PD-10. L'ITLC est également réalisé à la fin du marquage. Les anticorps marqués au bismuth 213 sont : 16F12-DTPA, 12G4-DTPA et le rituximab-DTPA.

B. RIT Auger

Le radionucléide utilisé dans le cadre de la RIT Auger sera l' ^{125}I . Il est fourni par la société Perkin Elmer (Boston, MA, USA) sous forme d'iodure de sodium. L'iode étant un halogène, son couplage à un AcM ne nécessite pas la présence d'un chélateur. Le marquage va résulter d'une réaction d'halogénéation spécifique des chaînes latérales des résidus tyrosines de l'anticorps. Plusieurs méthodes permettent de coupler l' ^{125}I à des anticorps mais dans le cadre de cette thèse nous n'utiliserons que la méthode dite Iodo-Gen [393].

Marquage de l'anticorps à l'iode 125 : la méthode Ido-Gen

Le réactif Iodo-Gen (1-3-4-6-tetrachloro3 α -6 α -diphenylglycouril, Sigma, St Louis, MO, USA) est commercialisé sous forme lyophilisée soluble dans du chloroforme. Le mélange de 3 mg d'Iodo-Gen pour 9 mL de chloroforme est distribué dans des tubes de 5 mL à raison de 120 μL par tube pour un marquage de forte activité spécifique. Le mélange est ensuite évaporé sous flux d'azote de manière à déposer l'Iodo-Gen sur les parois du tube. L'Iodo-Gen va ainsi activer par oxydation, les ions iodure I^- en ions iodonium I^+ .

Pour réaliser le marquage, on dépose dans un tube Ido-Gen préparé comme décrit ci-dessus, du tampon de marquage, l'anticorps à radiomarquer ainsi que l' ^{125}I (370 MBq/mg). Après avoir homogénéisé le mélange, on laisse incubé pendant 10 minutes dans de la glace. A cette étape, il est très important de vérifier le pH du mélange réactionnel qui doit être compris entre 6 – 8,5. La réaction est arrêtée par ajout de PBS-azide 0,1%. Le contenu du tube est ensuite élué sur une colonne PD10 (Sephadex G-25, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) préalablement équilibrée par 30 mL de tampon PBS 1X et 50 μL de sérum de souris. Cette étape va permettre de retenir l'iode libre dans la colonne et de ne récupérer que l'anticorps radiomarqué. L'élué se fait en 12 fractions de 500 μL par ajout de PBS 1X. Des douze tubes obtenus, on ne retient que les trois plus fortes activités obtenues. L'activité du marquage est ensuite déterminée à partir de ces 1,5 mL (pool des 3 tubes) à l'aide d'un compteur gamma (Cobra II auto-gamma, Packard).

METHODOLOGIE

I. Plan d'expérimentation *in vitro*

A. Mesure de la survie cellulaire

1. Test de survie clonogénique

Puck et Marcus ont établi dans les années 50, un seuil arbitraire de viabilité *in vitro* en considérant qu'une cellule irradiée subit rarement plus de 4 ou 5 divisions cellulaires si elle est « stérilisée » donc radiobiologiquement morte. Dans le test de survie clonogénique, la survie d'une cellule se traduit par le développement d'une colonie qui est définie par la présence d'au moins 50 cellules (de 2^5 à 2^6) [394].

Ainsi pour évaluer *in vitro* la survie des cellules traitées en RIT alpha, nous avons réalisé des tests de survie clonogéniques sur des cellules irradiées (cellules donneuses), mais aussi sur des cellules non irradiées (cellules receveuses) ayant juste reçu le surnageant des cellules donneuses. A J0, les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits dans un volume de 2 mL. Le nombre de cellulesensemencées était compris entre 100 et 5000. A J1, les différents anticorps radiomarqués sont ajoutés à des concentrations croissantes sur les cellules (0 – 0,5 MBq/mL, AcM-TCMC- ^{212}Pb ou AcM-DTPA- ^{213}Bi , incubation 90 minutes). Les puits témoins sont manipulés dans les mêmes conditions mais seul du milieu de culture est ajouté. Les cellules sont maintenues à l'incubateur (37°C, 5 % CO_2). Après le temps d'incubation, la radioactivité est retirée des cellules donneuses et elles sont lavées deux fois avec du PBS (2 × 2 mL). Ensuite 2 mL de milieu frais sont rajoutés sur les cellules donneuses et laissé pendant 2 h. A la suite de ces 2 h d'incubation, le surnageant (milieu conditionné) est récupéré et transféré sur des cellules non irradiées (cellules receveuses). 2 mL de milieu frais sont rajoutés sur les cellules donneuses et les deux types de cellules (donneuses et receveuses) sont maintenus à l'incubateur pendant 10 à 12 jours supplémentaires (Figure 34). Au terme de cette incubation, le milieu est retiré puis les colonies formées sont fixées à l'aide d'un mélange d'acide acétique/méthanol (1:3) pendant 20 min à 4 °C. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS et colorées avec une solution de Giemsa (Sigma St Louis, MO, USA). Les puits sont rincés avec du PBS et les clones sont comptés. La fraction de survie (FS) est calculée par rapport au nombre de colonies présentes dans les puits témoins.

$$\text{FS (\%)} = \frac{\text{Nbr de colonies des puits traités}}{\text{Nbr de colonies des puits témoins}} \times \frac{\text{Nbr de cellulesensemencés dans les puits témoins}}{\text{Nbr de cellulesensemencés dans les puits traités}} \times 100$$

Selon le même protocole, nous avons aussi évalué l'effet des anticorps non radiomarqués. Pour cela, la survie des cellules a été mesurée après mise en présence de concentration croissante d'anticorps nus (0 à 27 $\mu\text{g/mL}$ de milieu de culture) pendant 90 min. La survie a été exprimée en fonction de la quantité d'anticorps non radiomarqué.

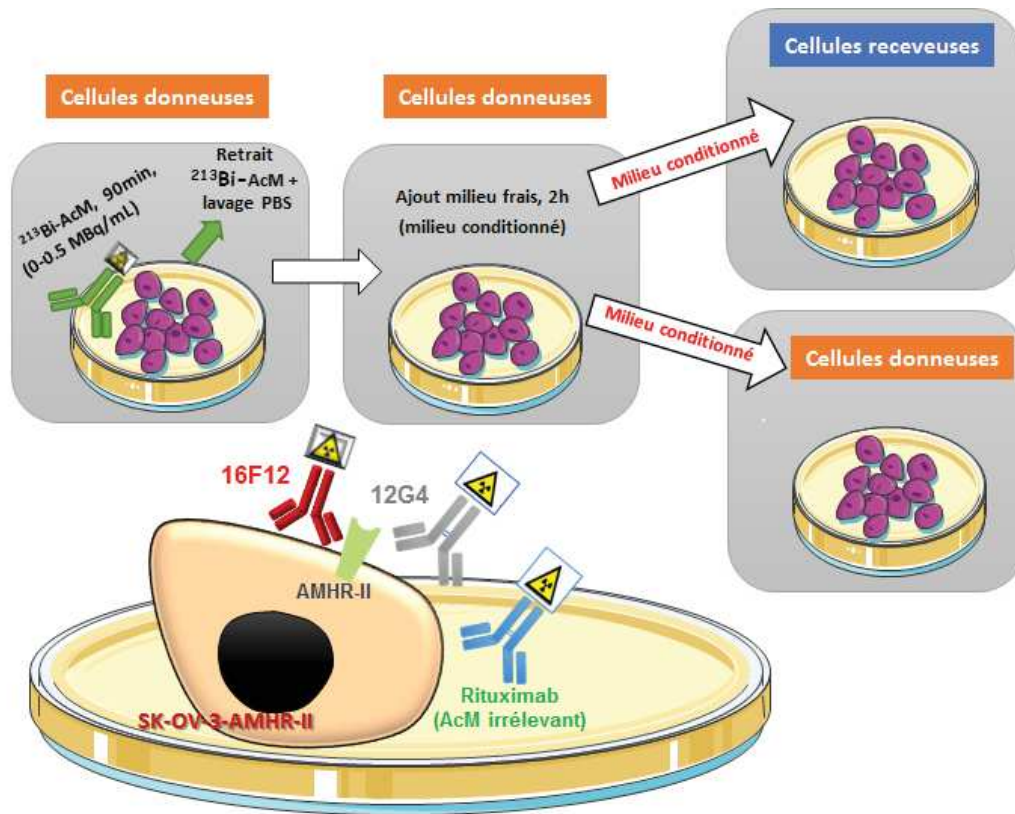


Figure 34 : protocole de transfert de milieu dans le cadre d'une RIT alpha au ^{213}Bi . Les cellules SK-OV-3_{AMHR-II} donneuses sont traitées avec des AcM-DTPA- ^{213}Bi pendant 90 min. la radioactivité est ensuite retirée et les cellules rincées au PBS. Du milieu frais est ajouté pendant 2h puis ce milieu est transféré sur des cellules receveuses. 12 jours plus tard les colonies sont révélées et le pourcentage de survie calculée.

Pour la RIT Auger, le même protocole a été utilisé. L'ensemencement des cellules donneuses variait entre 100 et 300 cellules. Les activités volumiques testées étaient comprises entre 0 – 4 MBq/mL et la RIT effectuée sur 48h.

2. Mesure de l'activité incorporée dans les cellules après la RIT alpha

Le test d'activité incorporée permet de mesurer la radioactivité totale associée aux cellules, qu'elle soit présente au niveau de la surface cellulaire ou internalisée au sein même de la cellule. Cette activité incorporée par les cellules ciblées par les différents anticorps radiomarqués a été déterminée de la manière suivante. Environ 1×10^4 cellules A-431_{CEA-Luc} et SK-OV-3_{AMHR-II} sont ensemencées dans 100 μL de milieu dans des plaques 96 puits. Le lendemain, la RIT a été réalisée avec les mêmes activités volumiques utilisées lors de la réalisation des tests de survie clonogénique. La RIT au ^{212}Pb et au ^{213}Bi se fait comme toujours sur un temps de 90 minutes. Après traitements, la radioactivité est retirée des puits et les cellules rincées 2 fois au PBS. Afin de contrôler l'exactitude du dépôt d'activité dans les puits, la radioactivité du milieu a été mesurée par comptage gamma (Hewlett Packard, San Francisco, CA, USA). Du milieu frais est ensuite déposé sur les cellules (Figure 35). A différents temps d'étude défini, les cellules sont décollées, centrifugées puis comptées en se servant d'une lame KOVA (Hycor Biomedical inc, USA). Un échantillon de suspension cellulaire est passé au

compteur gamma pour mesurer la radioactivité. L'activité par cellule (Bq/cellule) a été ensuite calculée et exprimée en fonction du temps. Pour chaque type cellulaire, ces expériences ont été reproduites 3 fois.

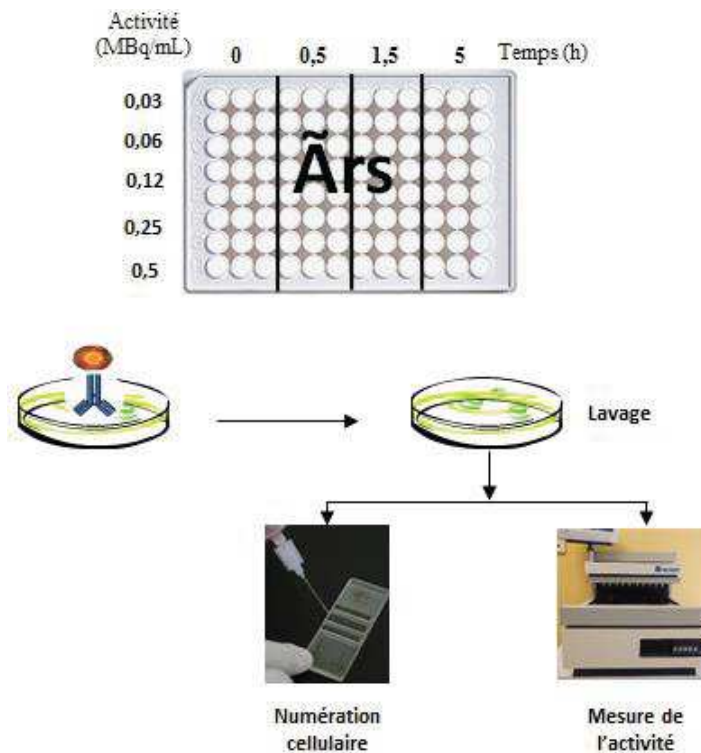


Figure 35 : mesure de l'activité incorporée dans les cellules dans le cadre d'une RIT alpha au ^{213}Bi . L'activité cumulée ($\tilde{A}rs$) est déterminée dans les cellules SK-OV-3_{AMHR11} à différents temps post traitements (0, 30 min, 90 min et 5h). La numération cellulaire est également faite

3. Dosimétrie cellulaire après RIT alpha

Cette partie du travail a été réalisé par le Dr Nicolas Chouin de l'équipe INSERM U892 à Nantes. La détermination de la dose absorbée par le noyau cellulaire au cours des différentes expériences de RIT, a été faite en considérant le modèle suivant : la cellule et son noyau sont assimilés à deux sphères concentriques homogènes, de densité de 1g/cm^3 (eau), de rayon cellulaire R_C et de rayon nucléaire R_N variables. Le calcul des facteurs S a été réalisé en utilisant le formalisme du MIRD cellulaire décrite par Goddu *et al.* [192].

On considère que la radioactivité cellulaire est distribuée uniformément dans chacun des compartiments cellulaires considéré. Le noyau est également considéré comme la cible des rayonnements. Trois formes d'irradiation sont alors distinguées :

- L'irradiation propre « *self-dose* » due à l'anticorps radiomarqué localisé en CS ou Cy de la cellule cible,
- L'irradiation de feu croisé « *cross-dose* » provenant de l'anticorps radiomarqué localisé en CS ou Cy d'une cellule voisine,

- L'irradiation non-spécifique « *volume-dose* » due à l'anticorps non-fixé présent dans un volume d'intérêt de milieu de culture cellulaire.

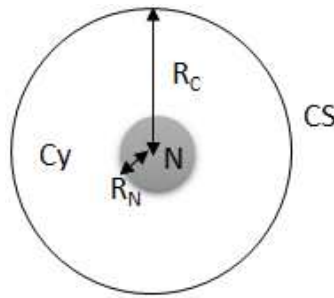


Figure 36 : représentation de la localisation de l'anticorps radiomarqué sur la cellule ciblée. (CS) le vecteur se fixe à la surface de la cellule ; (Cy) le vecteur est internalisé dans le cytoplasme.

Détermination des facteurs S

Les facteurs S ont été calculés pour chaque anticorps radiomarqués en considérant que les cellules formaient une monocouche compacte dans la boîte de culture. Pour chaque cellule, les trois formes d'irradiations ci-dessus présentées ont été considérées.

L'activité incorporée dans les cellules a été mesurée en fonction du temps. Ainsi, pour estimer l'activité au cours du temps dans le milieu, l'activité incorporée dans la cellule a été considéré comme négligeable par rapport à l'activité se trouvant dans la solution. Pour celui de l'activité intégrée par les cellules dans le temps, 50% de l'activité est considéré comme internalisé dans la cellule et reste piégé même après rinçage des cellules au PBS.

Le calcul des facteurs S a été effectué avec un algorithme de dosimétrie cellulaire validé pour cinq sources différentes: la surface de la cellule cible, le cytoplasme de la cellule cible, le volume extracellulaire, le cytoplasme des cellules voisines, la surface des cellules voisines, et une cible: le noyau de la cellule cible. Seule la contribution des particules alpha a été considérée dans le calcul: pour chaque désintégration du ^{213}Bi , il a été considéré qu'une particule α de 8,376 MeV a été émise, correspondant à celle émise par le polonium 213 ; et pour chaque désintégration du ^{212}Pb l'énergie alpha considérée est 7,8 MeV.

Des valeurs expérimentales $R_C = 11,5 \mu\text{m}$ et $R_N = 5,7 \mu\text{m}$ ont été mesurées par exemple pour les cellules SK-OV-3. Les cellules sont considérées en monocouche compacte c'est-à-dire, que la distance entre deux cellules est égale $2 \times R_C$. Pour chaque région source, la radioactivité a été supposée être uniformément répartie. Contrairement aux différents facteurs S , $S(N \leftarrow \text{Cy})$, $S(N \leftarrow \text{CS})$ qui sont bien définis [192], $S(N \leftarrow \text{Vol})$, $S(N \leftarrow \text{Cy cellule voisine})$ et le $S(N \text{ cellule cible} \leftarrow \text{CS des cellules voisines})$ dépendent de nos conditions expérimentales et doivent donc être déterminés. Le facteur $S(N \leftarrow \text{vol})$ correspond à la dose délivrée au noyau de la cellule pour une désintégration 1×10^{-3} par μm^3 dans une demi-sphère (afin de prendre en compte que les cellules étaient situées au fond du puits d'irradiation), centrée sur la cellule cible, avec un rayon: $R_N + 84,5 \mu\text{m}$ (cette valeur correspond au parcours maximal de la particule alpha d'énergie 8,376 MeV). Le volume occupé par les cellules de la monocouche a été retiré du

volume source. $S(N \leftarrow Cy \text{ cellule voisine})$ et $S(N \text{ cellule cible} \leftarrow CS \text{ des cellules voisines})$ correspondent à la dose délivrée au noyau de la cellule cible par une désintégration cytoplasmique ou surfacique dans les cellules voisines. Le tableau 10 résume les facteurs S calculés.

Tableau 10 : facteur S utilisé dans le calcul de la dosimétrie cellulaire après une RIT au ^{213}Bi

Forme d'irradiation	Facteur S	Cellules SKOV3 _{AMHR11} Dose moyenne au noyau (Gy)
Self-dose	$S(N \leftarrow Cy)$	1.203×10^{-2}
	$S(N \leftarrow CS)$	6.61×10^{-3}
Cross-dose	$S(N \leftarrow Cy)$	2.865×10^{-2}
	$S(N \leftarrow CS)$	3.021×10^{-2}
Volume-dose	$S(N \leftarrow Vol)$	5.2255×10^{-1}

B. Mesure des lésions de l'ADN

1. Immunofluorescence (IF)

Les lésions de l'ADN ont été mesurées par IF *via* la formation des foci γ -H2AX qui témoignent des cassures double brins de l'ADN et des foci 53BP1 qui sont des médiateurs impliqués dans la signalisation et la réparation des cassures double brins.

A J0, 3×10^5 cellules sont ensemencées sur de petites lamelles de 4 cm² (*covers slip*). A J1 les cellules sont incubées avec les anticorps radiomarqués. La RIT a été réalisée sur les cellules donneuses (0,5 MBq/mL, 90 min) puis le milieu conditionné (*Conditioned Medium*, CM) transféré au bout de 2h sur les cellules filles pendant 24h. Les cellules donneuses et receveuses sont ensuite fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 10 minutes à température ambiante. Après un rinçage au PBS, les cellules sont perméabilisées avec une solution de triton X-100 0,5% pendant 10 minutes, suivi d'une saturation de 1h à température ambiante (TA) avec du PBS-BSA 10 mg/mL. Les lamelles sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire sur la nuit à 4°C. L'anticorps anti-souris pH2AX *ser139* (Merck millipore, Yvelines France) est dilué au 1/200^{ème}, et l'anticorps anti lapin 53BP1 (Novus Biological, Cambridge UK) est dilué au 1/400^{ème} dans du PBS-BSA 10 mg/mL. Les anticorps secondaires anti-souris couplés avec le fluorochrome FITC et anti lapin couplé au TRITC dilués respectivement au 1/200^{ème} et 1/500^{ème} ont été incubés pendant 45 minutes à 37°C. Enfin, les lamelles sont incubées avec du Hoesch (Sigma Aldrich) 10 minutes dans l'obscurité à TA puis

montées au Mowiol[®] (Sigma Aldrich). Les lamelles sont ensuite examinées à l'aide d'un microscope à fluorescence inversé (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne).

2. Mesure des aberrations chromosomiques et des micronoyaux

Cette mesure a été réalisée uniquement sur la lignée A-431_{CEA-Luc} traitée avec les anticorps 35A7, trastuzumab et PX préalablement couplés au ²¹²Pb. A J0, 5×10⁵ cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits. A J1, la RIT au ²¹²Pb a été réalisée sur 90 min. Du milieu conditionné a également été préparé pour traiter les cellules receveuses. Après le traitement de RIT, les cellules donneuses et receveuses sont incubées pendant 3h avec 10 μM de Nocodazole (bloque les cellules en mitoses). Les cellules sont ensuite décollées et centrifugées 5 min à 1200 RPM (*Round Per Minute*). Le culot cellulaire est ensuite repris dans 10 mL d'une solution hypotonique KCl préchauffée à 37°C, pendant 10 min à 37°C. A la fin de cette incubation, 500μL d'une solution acide acétique/éthanol (1:3) est ajouté goutte à goutte puis les cellules centrifugées 5 min à 1200 RPM à 4°C. Le culot cellulaire est repris dans 7 mL de la solution acide acétique/éthanol (1:3) et les cellules centrifugées à nouveau. Cette étape sera répétée 3 fois de plus. Après la dernière centrifugation, les cellules sont repris dans 7 mL de la même solution et stocker à -20°C.

Pour visualiser les micronoyaux (MN), le surnageant a été enlevé et les cellules repris dans 1mL de la solution acide acétique/éthanol (1:3). Après une bonne homogénéisation, 10 μL de cette solution est prise et étalée sur une lame. Les cellules sont ensuite colorées avec du vectashield[®] (Vector Laboratories Inc, USA) et recouverte d'une petite lamelle. Le nombre de MN par cellule binucléée a ensuite été mesuré par analyse sous microscopie à fluorescence. Les expérimentations ont été réalisées au moins trois fois, pour chaque condition, et 500 cellules ont été observées en microscopie.

3. Mesure de l'expression des protéines

a) Par la technique de Western Blot

La technique du Western Blot est une méthode protéomique ayant recours à la biologie moléculaire pour détecter une protéine spécifique dans un échantillon donné d'extrait cellulaire. On recherche par cette technique l'activation (phosphorylation) ou la diminution d'une protéine après un traitement spécifique. La technique utilise l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour séparer les protéines, préalablement dénaturées, selon leur masse. La concentration du gel est définie en fonction de la taille de la protéine recherchée. Les protéines sont ensuite transférées depuis le gel sur une membrane, où elles sont exposées à un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt.

Quel que soit la lignée utilisée, à J0 5×10⁵ cellules sontensemencées en plaque 6 puits dans 1 mL de milieu de culture. Ces cellules sont traitées avec une activité de 0,5 MBq/mL pendant 90 minutes pour la RIT alpha (²¹³Bi-AcM; ²¹²Pb-AcM) et une activité de 4 MBq/mL pendant 48h pour la RIT Auger (¹²⁵I-AcM). Quant aux cellules receveuses, elles ont été traitées

pendant 24h avec le CM issu des différentes RIT. A la fin de chaque traitement, les cellules sont lavées au PBS puis recueillies dans un tube eppendorf avec du tampon de lyse SDS (bleu de bromophénol, 5% β -mercaptoéthanol, 2% de SDS, 10% de glycerol, Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,85%) et chauffées pendant 5 minutes à 100°C (bain à sec). Les échantillons sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

L'électrophorèse des protéines est réalisée sur gels SDS-PAGE. Un gel de 10 – 12 % d'acrylamide est utilisé en fonction du poids moléculaire des protéines évaluées. L'électrophorèse se fait à voltage constant, 80 V pour la migration dans la partie « running » du gel puis 120 V pour le reste de la migration. Après l'électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose 0,2 μ m (Bio-Rad) avec un appareil de transfert Bio-Rad (Trans-Blot® turbo). Après transfert, la membrane est bloquée pendant 1 heure dans du TBS-Tween 0,1%, 5% lait écrémé. L'anticorps spécifique de la protéine recherchée est alors ajouté sur la membrane et incubé sur la nuit à 4°C. Le lendemain, la membrane est lavée et incubée pendant 1h avec un anticorps secondaire couplé HRP (*Horse Radish Peroxydase*). La révélation de la protéine se fait ensuite en ajoutant une solution ECL (*enhanced chemiluminescence*, Bio-Rad) et l'image est acquise à l'aide d'une caméra CCD (GBox de la société SYNGENE).

b) Utilisation de membranes protéomiques

La phosphorylation des protéines a également été évaluée en utilisant un kit protéomique (R&D Systems, Minneapolis, MN). Il s'agit de membranes (*Human Phospho-Kinase Antibody Array*) capables de détecter la phosphorylation de 43 kinases. Ce kit a été utilisé en suivant les instructions données par le fournisseur. Brièvement 10×10^5 de cellules sont ensemencées et après traitement, misent dans le tampon de lyse du kit durant 30 minutes à 4°C. Le lysat est ensuite centrifugé et le surnageant recueilli et conservé à -80°C. La concentration de cet extrait protéique a été déterminée par la méthode de Bradford. Pour le dosage, l'extrait a été incubé sur la membrane du kit toute la nuit à 4°C et la révélation faite en utilisant les produits fournis dans le kit.

Un autre kit (*Human Cell Stress Array Kit*) a également été utilisé afin de mesurer un éventuel stress radio-induit sur les cellules donneuses et receveuses par le traitement de RIT.

C. Etude des mécanismes impliqués dans les effets bystander radio-induits

1. Implication des ROS

Comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique, les espèces réactives de l'oxygène sont impliquées dans les mécanismes initiés par les effets bystander. Afin d'évaluer l'implication de ces entités dans les effets bystander observés sur les cellules receveuses, nous avons réalisé le test de survie clonogénique basé sur le protocole de transfert de milieu. Dans ce cas-ci, les cellules donneuses sont pré-incubées pendant 15 min avec un inhibiteur de ROS

(catalase 20µg/mL (Sigma Aldrich) ; N-acétyl-L-cystéine 50µM (Sigma Aldrich) ou DMSO 0,5% (Sigma Aldrich)) suivi ensuite de l'ajout des anticorps radiomarqués toujours en présence de l'inhibiteur de ROS. A la fin du traitement, le milieu conditionné est préparé puis transféré sur les cellules receveuses. 12 jours après les colonies ont été comptés.

Une autre méthode a consisté à traiter directement les cellules receveuses avec le CM en présence ou non d'inhibiteurs de ROS. Toujours pour évaluer le rôle des ROS dans l'induction de l'effet bystander, l'apoptose a été évaluée sur les cellules receveuses après un traitement de 24h avec le CM en présence ou non des inhibiteurs de ROS.

2. Voies de signalisations impliquées dans les effets bystander

a) Les Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)

Les MAPKs jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes des cellules eucaryotes en reliant les signaux extracellulaires au système de contrôle des processus cellulaires fondamentaux tels que la croissance, la prolifération, la différenciation, la migration et l'apoptose [395], [396]. Trois grands groupes de MAPK sont connus chez les humains: ERK1/2, JNK/SAPK, et p38. Ces kinases peuvent être activées par des RI, des stress cellulaires (ROS par exemple), les cytokines et les facteurs de croissance.

Pour évaluer la phosphorylation ou non de ces protéines sur les cellules receveuses, des extraits protéiques ont été réalisés et le dosage effectué en Western Blot. La membrane protéomique (*Human Phospho-Kinase Antibody Array*) a également été utilisée.

L'implication de ces protéines a également été évaluée en réalisant un test de survie clonogénique sur les cellules donneuses en présence ou non des inhibiteurs respectifs de ces MAPKs. Inhibiteur de ERK1/2 (U0126, 1µM), JNK (SP600125, 10µM) et p38 (SB203580, 10 µM).

b) Les radeaux lipidiques

Il est maintenant connu que l'irradiation par des faisceaux externes de la membrane cellulaire conduit à la formation de domaines enrichis en céramides appelés radeaux lipidiques. Le céramide est un second messager impliqué dans la signalisation intracellulaire. Il est activé suite à l'hydrolyse de la sphingomyéline par l'acide sphingomyélinase (A-SMase). Pour cette raison, l'activité de l'A-SMase a été mesurée sur les cellules donneuses après RIT Auger (4 MBq/mL, incubation 24h) en utilisant le kit commercial Amplex Red Sphingomyelinase Assay Kit (Molecular Probes, Saint Aubin, France). Egalement la concentration de la sphingosine 1 (SP1) a été mesurée en utilisant le kit commercial Sphingosine-1-Phosphatase Assay Kit (Echelon Biosciences, Salt Lake City, UT).

L'activité de l'A-SMase a été mesurée par cytométrie de flux (FACS) sur les cellules donneuses traitées en RIT alpha ($^{213}\text{Bi-AcM}$). Après un traitement de 90 min, les cellules donneuses sont fixées dans du PFA 4%, puis incubées pendant 1h à 37°C avec l'anticorps polyclonal lapin anti- α -acide SMase 2µg/mL (Santa Cruz Biotechnology Inc). L'anticorps

secondaire anti-lapin conjugué FITC (Sigma Aldrich) dilué au 1/200^{ème} a été incubé pendant 45 min à 37°C. Après un dernier rinçage, les cellules sont passées au FACS.

Les radeaux lipidiques ont été mesurés par la technique d'IF. Après la RIT, les cellules donneuses sont fixées au PFA 4% puis perméabilisées avec du Trion X-100 pendant 15 min. Après lavage, les cellules sont saturées dans du PBS-BSA (1mg/mL) pendant 1h. Pour visualiser les radeaux lipidiques, les cellules donneuses ont par la suite été incubées pendant 45 min avec l'anticorps anti-cholera toxin B (CT-B) conjugué Alexa 488 (Sigma Aldrich) et les images acquises au microscope de fluorescence inversé (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne). Plus précisément, le rôle de la formation des radeaux lipidiques membranaires dans les effets bystander radio-induits par les ¹²⁵I-AcM a été évalué en co-incubant les cellules donneuses HCT 116 p53^{+/+} avec les anticorps couplés à l'iode en présence de 2,5µg/mL de filipine (Sigma Aldrich) sur la nuit. La filipine est un antibiotique connu pour désorganiser la formation des radeaux lipidiques.

c) Implication des cytokines

De nombreuses études ont montré que les facteurs sécrétés par les cellules irradiées et impliqués dans les effets bystander comprenaient des cytokines principalement des cytokines pro-inflammatoires. L'étude de l'implication des cytokines a également été étudiée dans ce projet. Pour cela j'ai utilisé la membrane *Human XL Cytokine Array Kit* (R&D Systems, Minneapolis, MN). Cette membrane est capable de détecter jusqu'à 102 cytokines. Après avoir réalisé des milieux conditionnés à la suite d'une RIT alpha au ²¹³Bi, le dosage de ces CM a été réalisé sur ces membranes conformément aux instructions du fournisseur.

d) Statistique

II. Plan d'expérimentation *in vivo*

La partie expérimentale *in vivo* est scindée en deux parties distinctes. Le ^{212}Pb sera utilisé dans le cadre d'une RIT classique et le ^{213}Bi sera utilisé pour une RIT intéressant une nouvelle technique développée par l'équipe. Un modèle de xénogreffe intrapéritonéale sera utilisé. En fonction de la lignée cellulaire utilisée, ce modèle mime chez l'animal les carcinomes péritonéales d'origine ovarienne ou colorectale que l'on peut rencontrer chez les patients, en particulier après résection chirurgicale de la tumeur primaire.

Lors de chaque expérimentation, outre l'étude de l'efficacité de la RIT sur le ralentissement de la croissance tumorale, un suivi de la toxicité sera effectué par observation de l'état clinique des souris, suivi de leur masse corporelle, numération de leur formule sanguine et l'analyse de paramètres biochimiques rénaux et hépatiques. Après sacrifice, une étude de biodistribution c'est-à-dire une répartition des molécules radiomarquées dans les différents organes sera réalisée. Ces données seront complétées d'une part par des analyses immunohistochimiques (IHC) qui évalueront l'expression de marqueurs d'atteinte cellulaire et d'autre part par une analyse par autoradiographie qui donnera des indications sur la distribution de la radioactivité à l'échelle tissulaire.

A. Radioimmunothérapie *in vivo* au ^{212}Pb

Cette étude fait suite à une précédente étude publiée par l'équipe [397]. L'efficacité et la toxicité de l'anticorps non internalisant ^{212}Pb -35A7 et celui de l'anticorps internalisant ^{212}Pb -trastuzumab a été évaluée dans le traitement des carcinomes péritonéales de petites tailles (2 – 3 mm). Des souris femelles Swiss Nude de 7 semaines (Charles Rivers) ont été greffées en IP avec $0,7 \times 10^6$ de cellules A-431_{CEA-Luc}. Trois jours après la greffe, la croissance tumorale a été déterminée par bioluminescence pour séparer les souris en groupes homogènes. Le jour suivant, les souris ont reçu une injection IP unique d'anticorps ^{212}Pb -35A7, ^{212}Pb -trastuzumab ou de ^{212}Pb -PX. Trois activités différentes ont été testées: 0,37 MBq (37 MBq/mg) (n = 12, 6 et 4 souris pour chaque anticorps), 0,74 MBq (37 MBq/mg) (n = 14, 7 et 6 souris) et 1,48 MBq (37 MBq/mg) (n = 10, 7 et 6 souris). Les groupes témoins ont reçu une injection IP de NaCl (n = 8). Grâce à la courbe de calibration tracée en bioluminescence, les souris traitées ont pu être suivies durant toute l'étude.

Dans le présent projet, il s'agira d'étudier la distribution de la dose à l'échelle tissulaire dans les différentes tumeurs traitées en utilisant un nouveau système d'imagerie digitale par autoradiographie (BetaIMAGER[®] System, Biospace Lab). La corrélation entre la distribution de la radioactivité et les marqueurs d'atteintes biologiques (atteintes ADN, apoptose, prolifération etc.) sera recherché. Ces données renseigneront sur le mode d'action de la RIT alpha et sur son efficacité/toxicité.

1. La technique d'autoradiographie digitale (DAR)

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action des trois ^{212}Pb -AcM, l'évaluation de l'hétérogénéité de distribution de la radioactivité au niveau de la tumeur a été réalisée en utilisant le DAR pour déterminer la distribution sur coupe de tissus de la radioactivité. Les souris ont été traitées uniquement avec une activité de 1,48 MBq (37 MBq/mg).

Les souris ont été sacrifiées à 4, 17 et 24 heures après la RIT puis les tumeurs récupérées. Toutes les tumeurs prélevées ont été déposées dans une cupule contenant de l'OCT (*Optimal Cutting Temperature compound*) puis congelées avec de l'azote liquide pour coupe Cryostat. Les échantillons sont conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Des cryo-coupes adjacentes de $10\ \mu\text{m}$ d'épaisseur ont ensuite été sélectionnés pour l'imagerie DAR et l'analyse histologique.

Le système de DAR utilisé pour déterminer la répartition spatiale des ^{212}Pb -AcM est un BetaIMAGER[®] (Biospace Lab) qui offre une résolution spatiale de $10 - 25\ \mu\text{m}$. L'échantillon a été recouvert d'une feuille scintillante pour convertir les électrons émis par le ^{212}Pb et ses descendants (^{212}Bi et ^{208}Tl) en photons qui sont détectés par une caméra CCD (*Charge-Coupled Devices*) amplifiée. Afin de tenir compte de la perte d'activité due à la désintégration du ^{212}Pb , les images ont été acquises pour un temps minimum de 30 minutes pour les tumeurs traitées pendant 4 h et jusqu'à 2 heures de temps pour les tumeurs traitées pendant 24 h. Les temps d'imagerie ont été arbitrairement choisis pour permettre la numérisation de toutes les cryo-coupes dans la même journée et surtout pour avoir encore assez d'activité dans les tumeurs. Les données finales ont été enregistrées sous la forme d'images binaires ($20 \times 20 \times 10\ \mu\text{m}^3$ de taille de voxel) et en coups par minute (CPM).

○ Calibration du système d'autoradiographie

Cette partie de l'étude qui inclut la dosimétrie *in vivo* des ^{212}Pb -AcM a été réalisée par le Dr S Marcatili de l'équipe de dosimétrie INSERM U 1037 au centre de recherche en cancérologie de Toulouse avec lequel le laboratoire collabore.

L'activité dans les différentes coupes de tumeur a été déterminée immédiatement après sacrifice des souris. L'utilisation d'un compteur gamma préalablement calibré et sélectionnant la raie gamma $238,6\ \text{keV}$ du ^{212}Pb , a permis de déterminer des activités de 2,8 à 45,3 Bq. Puisque l'activité du ^{212}Pb est mesurée directement, sans contamination de ses descendants, les valeurs obtenues sont exempts de biais possibles, même pour des temps précoces, lorsque l'équilibre séculaire n'est pas encore atteint.

Les mêmes coupes ont ensuite été analysées avec le BetaIMAGER[®] afin d'établir un facteur de calibration pour les images du DAR. Le BetaIMAGER[®], mesure principalement des particules β du ^{212}Bi et du ^{208}Tl . Toutefois, il convient de noter que, pour les coupes tumorales correspondantes aux souris sacrifiées à 4 heures, l'équilibre séculaire (de 5h pour le ^{212}Pb) n'était pas encore atteint (Figure 37), en particulier pour le ^{208}Tl . Pour le temps 17 heures, d'autre part, le ratio d'activité du ^{208}Tl et du ^{212}Pb était seulement 3% de moins que le même ratio à l'équilibre.

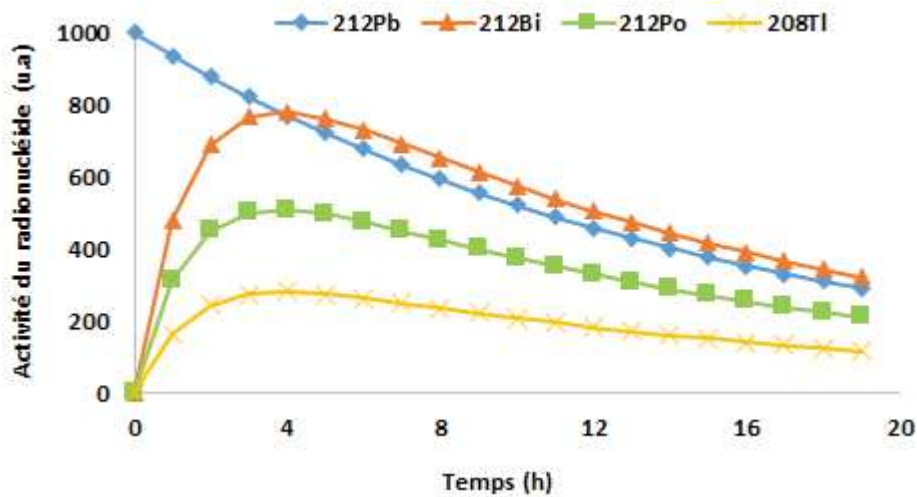


Figure 37 : schéma de désintégration radioactif du ^{212}Pb et de ses descendants. L'équilibre séculaire entre le ^{212}Pb et le ^{212}Bi est atteint à $t = 5\text{h}$.

Compte tenu de la faible radioactivité dans les coupes et les faibles temps d'acquisition, les images DAR obtenues étaient assez bruitées avec seulement quelques coups par voxel, en moyenne. Par conséquent, les images DAR ont préalablement été lissées en faisant une moyenne des voxels sur un rayon de 2 voxels, puis un masque a été appliqué permettant de mettre tous les voxels extérieurs au volume de la tumeur et ayant moins de 2 coups par minute (CPM) à zéro. De cette façon, il était possible de supprimer les coups parasites produisant des halos artificiels autour de chaque tumeur.

Les activités du ^{212}Pb et des électrons obtenus à partir des deux séries de mesures (compteur gamma et DAR) ont été comparées pour obtenir une courbe de calibration pour les images DAR (Figure 38). Etant donné que les deux mesures ont été effectuées environ 1 heure après dissection des souris, les données ne sont pas corrigées pour la décroissance physique du ^{212}Pb dans ce laps de temps. Les erreurs de Poisson ont été considérées pour les CPM_{DAR} . En supposant une réponse linéaire sans compensation, le facteur de calibration suivant (K_{DAR}) pourrait être déduit :

$$K_{\text{DAR}} = \frac{A \text{ (Bq)}}{\text{CPM}_{\text{DAR}}} = 1,432 \times 10^{-4}$$

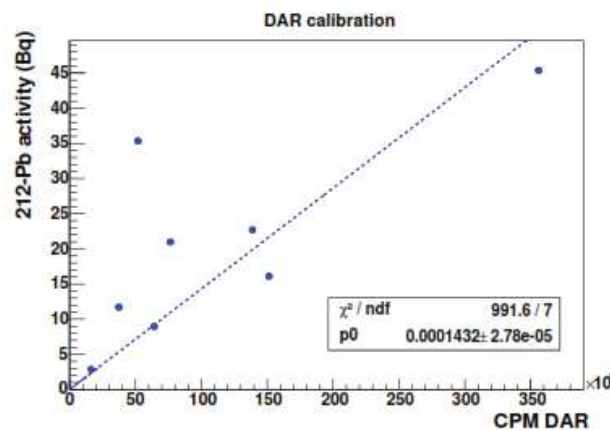


Figure 38 : courbe de calibration du DAR.

○ *Les courbes de l'activité en fonction du temps*

Toutes les tumeurs des images DAR ont été segmentées par seuillage, afin d'obtenir le nombre total de voxels par tumeurs N_t dans la coupe. Dans la plupart des tumeurs traitées avec le ^{212}Pb -35A7, un grand nombre de voxels de la région centrale, ne présentaient aucune absorption de la radioactivité. Afin d'inclure tous les voxels tumoraux dans la segmentation, l'outil *fill holes* du logiciel ImageJ (*Image processing and analysis in Java*, National Institutes of Health, USA) a été appliqué aux images seuillées. Dans les deux cas, l'image de coloration HES (hématoxyline éosine safran) correspondante a été utilisée comme référence pour valider visuellement la segmentation.

Pour chaque souris, l'activité spécifique A_t (Bq/g) de la masse tumorale (comprenant tous les nodules) a été calculée ainsi :

$$A_t = \frac{CPM_{total} k}{N_t M_{voxel}}$$

où CPM_{total} correspond aux coups totaux de l'image DAR du nodule segmenté et M_{voxel} est la masse du voxel en grammes. Lorsque plusieurs tumeurs se retrouvent sur une même coupe, leur activité spécifique est moyennée. Les activités spécifiques moyennes résultant et les écarts types ont donc été utilisés pour construire les courbes de l'activité de chaque ^{212}Pb -AcM en fonction du temps (Figure 39).

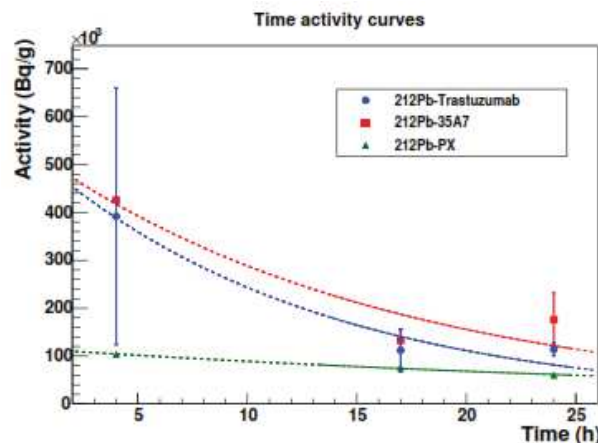


Figure 39 : courbes de l'activité spécifique obtenues à partir des images DAR des tumeurs traitées avec les trois ^{212}Pb -AcM.

2. Dosimétrie de la tumeur

Deux techniques différentes ont été utilisées pour le calcul de la dose absorbée par la tumeur à partir des images du DAR. En première approximation, la dose absorbée moyenne de la tumeur a été calculée en supposant une forme sphérique et une distribution homogène du radiopharmaceutique (dosimétrie standard), tandis que dans le second cas, l'hétérogénéité de la radioactivité dans la tumeur a été prise en compte pour obtenir la distribution de la dose absorbée au niveau du voxel (dosimétrie du voxel). Pour ces deux approches, seul le facteur self dose de la tumeur a été considéré en tenant compte du faible parcours des particules α du

^{212}Pb qui irradie très peu les tissus sains environnants. Dans les deux cas, la technique de Monte Carlo a été appliquée en utilisant l'outil de simulation de dose GATE de la plateforme GEANT4 [398].

a) Simulation de la source de ^{212}Pb

La simulation Monte Carlo d'une source radioactive dans GATE nécessite de définir, tous les rayonnements émis en termes d'énergie et de probabilité d'émission. Pour plus de commodité, les émissions sont généralement classées selon le type de particules (électrons mono-énergétique, photons mono-énergétique, particules alpha et bêta) pour définir des macros sources distinctes avec des probabilités d'émissions différentes. Au moment de l'exécution du code, la probabilité d'un événement issue de la macro source i , est donnée par la somme des probabilités d'émission (particules/Bq.s) de tous les rayonnements compris dans la macro source donné. Ces probabilités, calculées en utilisant les données de désintégrations énumérées par Eckerman *et al.* [399], sont présentées dans le tableau 11.

Tableau 11 : probabilité d'émission des rayonnements (particules/Bq.s) du ^{212}Pb et de ses descendants. Les valeurs sont données pour chaque type d'émission. Dans la dernière ligne, les ratios d'embranchement (Branching Ratio, BR) de chaque radionucléide sont également donnés.

Probabilité d'émission des rayonnements (particules/Bq.s) dans la chaîne de désintégration du ^{212}Pb				
Type de particule	^{212}Pb	^{212}Bi	^{208}Tl	^{212}Po
Photons	6,566219	4,268342	3,635647	0,000000
Electrons	5,561768	4,013696	1,224487	0,000000
beta	1,000001	0,640600	1,000001	0,000000
alpha	0,000000	0,359400	0,000000	1,000000
BR	1,000000	1,000000	0,359400	0,640600

Pour la simulation d'une chaîne de désintégration radioactive comme dans le cas du ^{212}Pb , les ratios d'embranchement (BR) du parent et des radionucléides descendants devraient être pris en compte. Onze macros sources distinctes ont donc été définies pour inclure tous les types d'émissions provenant des 4 radionucléides de la chaîne de désintégration du ^{212}Pb . Leur probabilité d'émission relative a été calculée comme suit : *particule/Bq.s émis* \times *BR* pour chaque macro source. L'énergie de recul associée à la désintégration du ^{212}Bi et du ^{212}Po est négligée.

b) Dosimétrie standard : Dose moyenne absorbée par la tumeur

Les nodules tumoraux des images du DAR ont tous été analysés individuellement pour calculer leur dose moyenne absorbée. Les masses des nodules ont été estimées en faisant deux hypothèses : (i) ils étaient de forme sphérique et (ii) l'image DAR a été prise au centre de la coupe. Par conséquent, le rayon a été calculé comme étant $(A/\pi)^{1/3}$ où A est l'aire de la tumeur en mm^2 calculée à partir des images du DAR.

Les facteurs S du ^{212}Pb ont été calculés en considérant des sphères d'eau de rayons de 0,1 à 1,0 mm. La liste standard de la physique hadronique (*hadrontherapyStandardPhys.mac*) disponible dans le dossier « *exemple/exemple_PhysicsLists* » du code GATE a été utilisée. Le processus de *hMultipleScattering* a été ajouté pour tenir compte de la diffusion multiple des particules alpha. Une gamme de coupe de 1 μm a été choisie. Cinq millions de particules primaires ont été générés afin d'obtenir une incertitude statistique négligeable sur la dose moyenne absorbée (<0,1%). Les résultats des facteurs S sont présentés dans la figure 40 en fonction du rayon de la sphère.

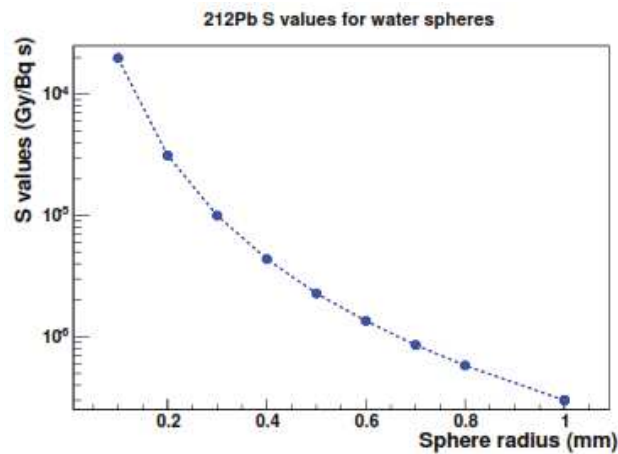


Figure 40 : facteur S du ^{212}Pb calculés à partir de sphère d'eau.

Les facteurs S de toutes les sphères (allant du minimum au maximum du rayon de la tumeur) ont été extrapolés par interpolation linéaire des données simulées, et ensuite utilisés pour calculer la dose absorbée de chaque nodule en tenant compte de sa taille spécifique (masse estimée) et des activités cumulées spécifiques (Bq.s/g) obtenues pour les trois ^{212}Pb -AcM.

A priori, les hypothèses faites pour extraire les masses des nodules à partir des images 2D du DAR peuvent conduire à l'utilisation de faux facteur S pour une tumeur donnée: cela peut introduire un certain niveau d'erreur dans le calcul de la dose absorbée. Pour cette raison, une approche alternative qui ne prend pas en compte la masse de la tumeur a également été considéré [397]. La dose absorbée par la tumeur D_t a été alors calculée en supposant que toute l'énergie émise dans la tumeur ($E_{\text{dep}} = 8,7 \text{ MeV/Bq.s}$) est déposée au sein de la tumeur elle-même (approximation de la self-absorption):

$$D_t(\text{Gy}) = \frac{E_{\text{dep}}(\text{J})}{\text{masse}(\text{g}) \cdot 10^{-3}} \tilde{A}_t(\text{S/g}) \text{ masse (g)}$$

c) Dosimétrie à l'échelle du voxel

La question évidente du calcul de la dose tumorale absorbée à partir des images du DAR est d'extrapoler la distribution de la dose absorbée en 3D sur la base d'une distribution d'activité 2D. Ce problème a été résolu en effectuant deux simulations Monte Carlo différentes (Figure 41). Dans la première simulation (modèle 2D), la tumeur a été modélisée comme bidimensionnel (plan XY), afin d'évaluer la pénétration des émissions du ^{212}Pb dans la troisième dimension (Z). Pour la seconde simulation, cette information a été utilisée pour construire un modèle 3D fictif de la tumeur (modèle semi-infini). Cette approche a permis de prendre en compte, non seulement la dose due à l'activité dans la région de la tumeur considérée, mais aussi la dose due à l'activité dans les régions contiguës. Pour les deux simulations, les mêmes paramètres de la liste standard de physique hadronique ont été adoptés pour générer les facteurs S qui ont été utilisés. Néanmoins, une valeur de $0,1 \mu\text{m}$ a été utilisée à la place de la valeur par défaut qui est de $20 \mu\text{m}$. Dans une géométrie de voxel, en effet, ce paramètre (épaisseur des coupes) doit être fixé à des valeurs inférieures à la taille du voxel, afin d'éviter des artéfacts dans la distribution de l'énergie. En règle générale, une valeur égale au $1/20$ de la hauteur du voxel est généralement considérée comme appropriée. Pour chaque simulation, 5 millions d'événements primaires ont permis d'avoir une incertitude statistique de voxel $<1\%$ pour tous les voxels considérés.

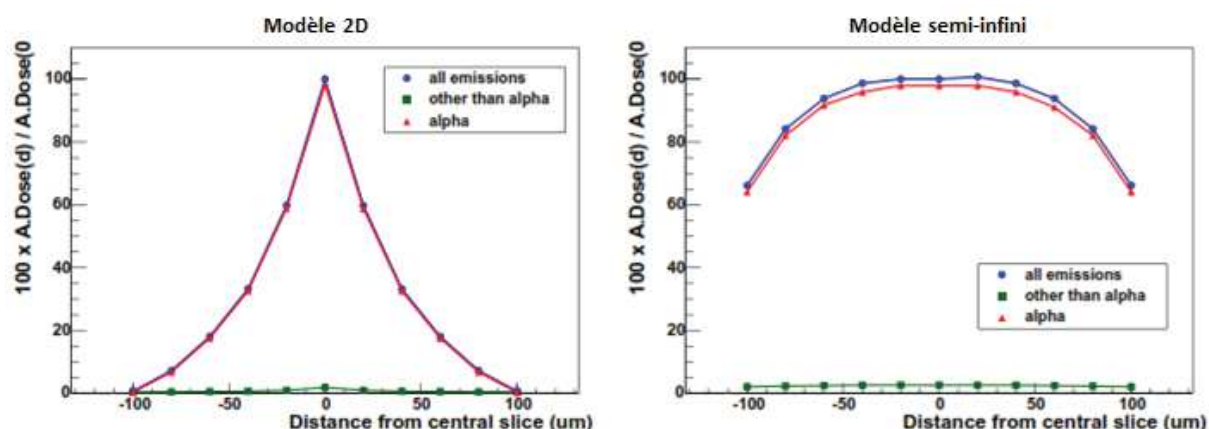


Figure 41 : modèles d'extrapolation des doses absorbées par les tumeurs traitées en RIT du ^{212}Pb à partir des images de DAR. En rouge la dose absorbée, uniquement due aux émissions α ; en vert la dose absorbée due aux autres émissions (β , γ) ; en bleu la dose absorbée par la tumeur en tenant compte de toutes les émissions (α , β et γ).

3. Mesures de paramètres biologiques après RIT au ^{212}Pb

a) Coloration à l'hématoxyline éosine safran (HES)

Cette partie de l'étude a été réalisée par la plateforme RHEM (Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier) de l'IRCM. Différents tissus (tumeurs et organes sains) de la souris traitée seront prélevés, coupés et colorés à l'hématoxyline éosine safran (HES). Cette

coloration permettra notamment une étude morphologique des différents tissus et sera très utile pour la dosimétrie afin de faire une correspondance avec les tumeurs utilisées en DAR. L'analyse par coloration HES permettra aussi l'étude des lésions biologiques radio-induites.

b) Immunohistochimie (IHC)

L'IHC a été réalisée sur les coupes tumorales traitées au temps $t = 17h$. Le marquage des tissus est fait en se basant sur le même protocole utilisé en immunofluorescence. Cette analyse permettra notamment d'évaluer le niveau d'expression de marqueurs tissulaires de mort cellulaire (Caspase 3), de prolifération (Ki67), d'atteintes de l'ADN des cellules irradiées (53BP1). Grâce aux images du DAR, une corrélation entre la distribution de la radioactivité et les marqueurs d'atteintes biologiques ci-dessus cités sera faite. Ces données renseigneront ainsi sur le mode d'action de la RIT alpha et sur son efficacité/toxicité.

Une corrélation spatiale entre la dose et les effets biologiques observés indiquera une action essentiellement balistique de la RIT alpha alors qu'une absence de corrélation indiquera la présence d'effets non-ciblés qui signifieront qu'une action de la RIT alpha peut être attendue au-delà du périmètre d'action des particules depuis leur point d'émission ($<100 \mu m$).

4. Etude des paramètres hématologique et biochimique après RIT au ^{212}Pb

Durant le traitement, la toxicité hépatique et rénale sera évaluée par analyse biochimique. L'analyse de la toxicité hématologique (Numération Formule Sanguine, NFS), ne sera pas faite dans la présente étude car, elle l'a déjà été dans l'étude précédente de la RIT au ^{212}Pb [397]. Cinq paramètres seront étudiés : (i) deux paramètres rénaux (créatinine, urée) ; (ii) trois paramètres hépatiques (ALAT/GPT, ASAT/GOT et PAL).

La fonction urinaire est évaluée par le dosage de la créatinine plasmique et l'urée. La créatinine est produite en quantité constante dans l'organisme (sauf augmentation du catabolisme/effort important ou fièvre), et provient du métabolisme musculaire. Plus exactement, la créatinine est un produit de dégradation de nos muscles. Elle est essentiellement éliminée par les reins. Le dosage de la créatinine dans le sang permet avant tout de connaître le fonctionnement des reins et de détecter une éventuelle insuffisance rénale. L'urée est formée dans le foie, à partir de l'ammoniac (provient de la dégradation terminale de trois acides aminés : l'arginine, la citrulline et l'ornithine). Elle est éliminée par l'urine, mais l'intensité de la réabsorption dépend largement du niveau de la concentration urinaire (réabsorption plus forte quand la concentration est plus élevée). L'insuffisance rénale augmente l'urémie c'est pourquoi le dosage de l'urée peut permettre d'évaluer l'état physiologique des reins. Mais ce dosage est moins fiable que celui de la créatinine pour évaluer la fonction rénale car la variation de son taux dépend également d'autres facteurs : il augmente en particulier lors des régimes riches en protéines.

Quant à la fonction hépatique, son évaluation se fait par dosage du taux sanguin des enzymes hépatiques. Ce taux est élevé dans le cas de cytolysse hépatique (hépatites virales par

exemple). Les transaminases impliquées dans la cytolyse hépatique sont les ALAT (Alanine Amino Transférase ou Glutamate Pyruvate Transaminase, GPT) présentes dans les muscles striés mais surtout dans le foie, et les ASAT (Aspartate Amino Transférase ou Glutamate Oxaloacétique Transaminase, GOT) qui se retrouvent en quantité importante dans les muscles cardiaque et squelettiques, dans le foie, le rein et le cerveau. Une atteinte de ces différents organes, comme lors d'un infarctus du myocarde ou d'une hépatite entraîne la libération de ces différents enzymes dans le sang et l'augmentation de leur taux dans le plasma sanguin. Ainsi dans les maladies du foie, l'élévation des ALAT (GPT) est supérieure à l'élévation des ASAT (GOT), alors que dans les maladies des muscles, c'est l'inverse qui est observé.

En cas de cholestase, c'est-à-dire obstruction des voies biliaires (intra ou extra-hépatiques; intra = liée à un problème de l'hépatocyte lui-même; extra = liée à la présence d'un obstacle mécanique gênant l'évacuation de la bile au niveau de l'arbre biliaire), les sels biliaires sont refoulés au niveau hépatique, créant une lyse de la paroi des hépatocytes, qui libèrent ainsi ses enzymes au niveau sanguin. La cholestase se manifeste également par une hypovitaminose K, l'augmentation de la bilirubine conjuguée, des gamma GT et de la phosphatase alcaline, PAL.

○ *Protocole expérimental*

La mesure des paramètres biochimiques se fera par un prélèvement sanguin rétro-orbital chez les souris à l'aide d'un tube capillaire. Un intervalle de temps de 72h sera respecté entre chaque prélèvement (volume prélevé > 200 µL à chaque fois).

L'analyse du sang prélevé est effectuée avec l'analyseur de biochimie à paramètres unitaires RefloVet[®] Plus. Pour chaque paramètre mesuré, 32 µL de sang total, sérum ou plasma est nécessaire. Le temps d'analyse est de 2 à 3 minutes. Parmi les 17 paramètres biochimiques pouvant être mesurés, seulement les 5 paramètres ci-dessus décrits seront évalués dans ce projet.



Figure 42 : analyseur de biochimie Reflo Vet utilisé

Pour le suivi des souris, une toxicité précoce (étude sur 1 mois) des souris xéno greffées et traitées avec les ²¹²Pb-AcM sera réalisée. Une toxicité tardive sera de même réalisée cette fois-ci sur des souris saines (non greffées) et traitées uniquement avec l'anticorps non spécifique ²¹²Pb-PX et le suivi des souris effectués sur 8 mois.

B. Radioimmunothérapie flash au ^{213}Bi ou BIP-RIT versus RIT IP classique

Le but de cette étude sera de comparer l'efficacité d'une RIT IP classique consistant en une seule injection IP d'anticorps radiomarqués au ^{213}Bi à celle d'une RIT flash ou BIP-RIT (*Brief Intraperitoneal RIT*).

Cette expérimentation devait se faire au départ sur le modèle ovarien SK-OV-3 en ciblant le récepteur AMHR-II. Mais en raison de la très faible expression de ce récepteur lorsque les cellules sont xénotransplantées, la lignée AN3CA exprimant naturellement ce récepteur a été finalement utilisée. La greffe a consisté en une injection IP de $4,5 \times 10^6$ cellules AN3CA avec du matrigel dans un volume de 200 μL . Le traitement a été lancé à J11 post greffe, c'est-à-dire lorsque les nodules de carcinomes péritonéaux ont atteint une taille de 2 – 3 mm.

1. La technique de RIT flash

La RIT flash est une nouvelle approche thérapeutique qui a été validée par l'équipe dans le cadre d'utilisation d'émetteurs d'électrons Auger [389]. Elle consiste en une forte activité IP choisie de façon arbitraire et correspondant généralement à 3 – 5 fois l'activité injectée en IP classique de l'anticorps radiomarqué (^{213}Bi -AcM). Les ^{213}Bi -AcM sont injectés avec un volume total de 2 mL dans la souris. 30 minutes après injection de l'anticorps radiomarqué, les souris sont endormies avec une solution contenant de la kétamine (100 mg/kg [Ketamine Panpharma; Panpharma]) et de la médétomidine (1 mg/kg [Dormitor; Pfizer]). La cavité péritonéale est ensuite lavée en faisant circuler un volume de 25 mL de sérum physiologique dans l'abdomen de la souris, qui est récupéré *via* deux drains et des pompes péristaltiques (Figure 43). Cette approche permet d'augmenter par rapport à une injection IP standard, le ratio de fixation des ^{213}Bi -AcM aux nodules tumoraux par rapport aux tissus sains.

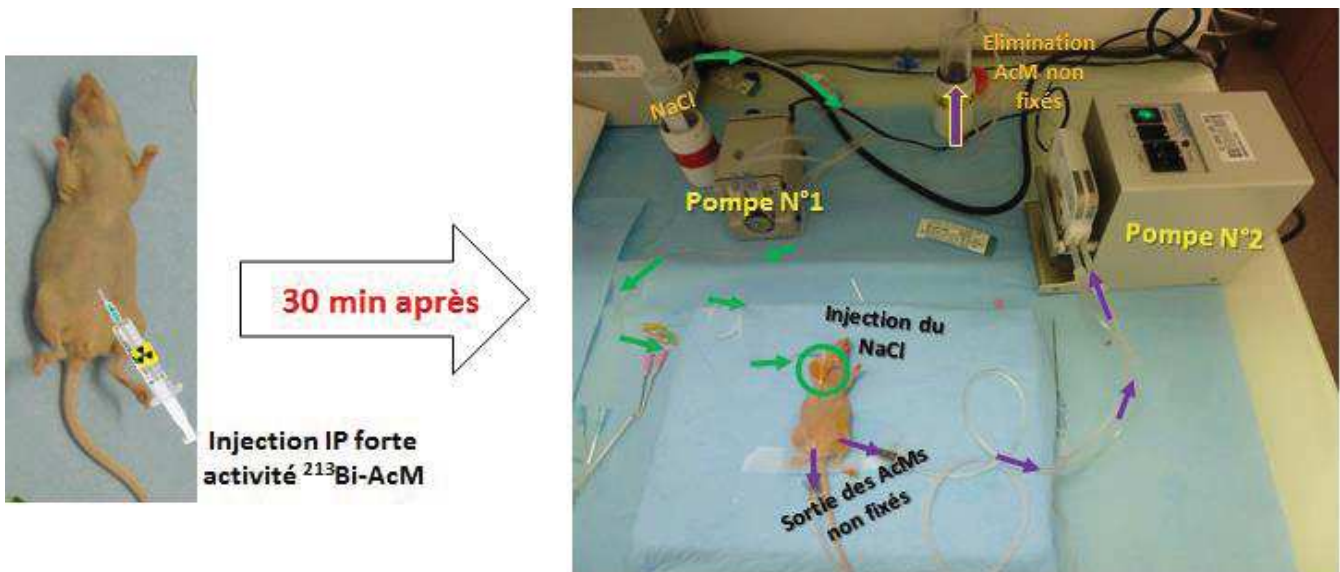


Figure 43 : schéma illustrant le procédé de la technique de RIT flash.

2. Etude de la biodistribution des anticorps radiomarqués

Cette étude a permis de déterminer la distribution spatiale de l'anticorps radiomarqué. Cette biodistribution a été réalisée après RIT IP classique et après RIT flash et les résultats comparés.

a) Protocole expérimental

La biodistribution a été réalisée avec le ^{213}Bi -16F12 sur des souris porteuses de xénogreffe IP de cellules AN3CA. Deux grands groupes de souris ont été formés : le premier groupe a été traité en RIT IP classique avec une activité de 5,9 MBq (qsp 0,35 mg anticorps total) et le deuxième groupe en RIT flash avec une activité de 10,2 MBq (qsp 1 mg anticorps total). Les souris ont été par la suite sacrifiées aux temps 1h et 3h après injection du ^{213}Bi -16F12. Les différents organes ainsi que les tumeurs sont récupérés. Les organes ont été pesés et la radioactivité mesurée au compteur gamma. Les nodules de carcinose péritonéale ont été minutieusement prélevés, placés sur une feuille de papier millimétrée pour en estimer la taille puis la masse tumorale globale de chaque souris a été calculée à chaque temps. La radioactivité a été mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation gamma. Ces données serviront de soutien à l'approche dosimétrique selon le formalisme du MIRD. Pour calculer l'activité incorporée dans chaque organe, l'activité mesurée au compteur gamma a été corrigée en tenant compte de la décroissance physique du ^{213}Bi . Les résultats sont exprimés en pourcentage d'Activité mesurée par gramme de tissu (% MA/g tissu) pour la tumeur et les organes.

Le calcul de la masse tumorale a été réalisé en déterminant en premier lieu, le volume de chaque nodule péritonéal. Pour cela, la forme d'un nodule de carcinose péritonéale a été approximé à celle d'un ellipsoïde (Figure 44) dont l'expression du volume est donnée par la formule : $V = \frac{4}{3} \times \pi \times \frac{H}{2} \times \frac{L}{2} \times \frac{P}{2}$ (V est mm^3 , H, L et P en mm).

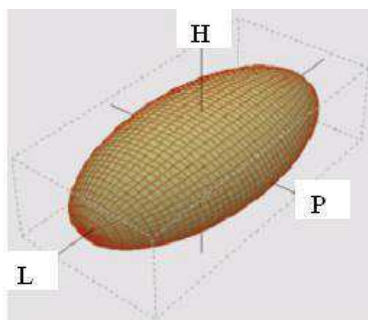
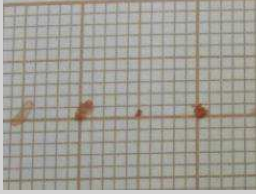


Figure 44 : représentation schématique d'un nodule de carcinose péritonéale.

Sur papier millimétré, ne peuvent être déterminées que les 2 dimensions H et L. Pour calculer le volume, nous avons supposé que $P = H$. Les dimensions ont été mesurées à l'aide du logiciel de traitement d'images *ImageJ*.

La masse du nodule a ensuite été déduite par $m = V \times d$; d étant la densité. Nous avons utilisé comme valeur $d = 1,05 \text{ g/cm}^3$.

Par exemple, pour la souris B du groupe II RIT flash on a :

Mesure	Dimensions		Volume	Masse (g)
	mm		mm ³	d = 1,05 g/cm ³
	H	L		
	2,3	0,9	2,49	$2,6 \times 10^{-3}$
	1,9	1,3	2,46	$2,5 \times 10^{-3}$
	0,5	0,3	0,04	$4,1 \times 10^{-5}$
1,1	1	0,63	$6,6 \times 10^{-4}$	

Masse tumorale totale en g = $5,9 \times 10^{-3}$

Ainsi, la masse de la tumeur est considérée comme la somme des masses des différents nodules qui se sont développés chez la souris. Le pourcentage d'Activité mesurée par gramme de tissu (% MA/g tissu) a été calculé suivant la formule suivante :

$$\% \text{ MA/g tissu (Bq/g)} = 100 \times \left[\frac{\text{Activité mesurée dans l'organe}}{\text{Activité totale mesurée dans la souris}} \right] / \text{masse de l'organe}$$

b) Détermination de l'activité incorporée en condition de RIT

La détermination de l'activité incorporée par les tissus (Bq) dans les conditions réelles de RIT a été extrapolée à partir de l'activité mesurée dans les différents tissus lors des expériences de biodistribution. Les paramètres suivants ont par ailleurs été pris en compte :

- un facteur multiplicatif de 3,6 et 2 a été appliqué respectivement pour la RIT flash et pour la RIT IP classique, afin de prendre en compte le rapport qui existe entre l'activité injectée lors de la biodistribution et celle injectée lors de la RIT à savoir 10,2 MBq et 37 MBq pour la RIT flash pour une même quantité d'anticorps injecté (1 mg) ; 5,92 MBq et 12,95 MBq (qsp 0,35 mg) pour la RIT IP classique.
- d'autre part, il a été nécessaire de prendre en considération la différence de masse des tissus entre la biodistribution et la RIT.

En ce qui concerne les organes sains, dont la masse est sensiblement la même lors de la RIT et lors de la biodistribution et varie peu au cours de l'expérimentation, seul le facteur 3,6 ou 2 selon le type de RIT réalisée, a été pris en compte pour calculer les activités incorporées en condition de RIT.

En revanche pour la tumeur, en plus du facteur appliquée (3,6 ou 2 selon le type de RIT), nous avons tenu compte de la différence de masse des carcinoses péritonéales entre la biodistribution et la RIT ainsi que de sa variation au cours du temps. Pour cela, nous avons calculé l'activité incorporée par g de tumeur (en Bq/g) aux différents temps de dissection. Afin de déterminer l'activité réellement fixée par la tumeur lors de la RIT, ces activités incorporées massiques ont été multipliées par la masse de la tumeur obtenue en condition de RIT.

Les aires sous les courbes des activités incorporées en fonction du temps ont par la suite été calculées pour chacun des organes sains et la tumeur par la méthode des trapèzes donnant les activités cumulées (\tilde{A}_{RIT}) en Bq.s sur une période de 3h.

c) Dosimétrie

Le formalisme du MIRD a été utilisé pour calculer la dose moyenne à l'échelle de l'organe. L'équation suivante [400] est celle qui a été utilisée pour déterminer la dose moyenne délivrée aux tissus :

$$D_{T \leftarrow S} = \frac{\tilde{A}_S \times \Delta \times \varphi_{T \leftarrow S}}{M_T}$$

Où :

\tilde{A}_S : représente l'activité cumulée dans l'organe source (S)

Δ : l'énergie émise par désintégration par le radionucléide,

$\varphi_{T \leftarrow S}$: la fraction d'énergie émise par le radionucléide depuis l'organe source qui est absorbée par l'organe cible (Target, T),

M_T : la masse moyenne de l'organe cible.

L'activité cumulée dans l'organe source est égale à (\tilde{A}_{RIT}), déterminé précédemment. En ce qui concerne l'énergie émise par désintégration Δ , seule l'énergie de 8,376 MeV émise par le ^{213}Po lors de la désintégration du ^{213}Bi a été prise en compte et en considérant que toute cette énergie émise est absorbée dans l'organe source. Ainsi, l'absorption par les autres organes est négligeable et chaque organe devient sa propre source. On a donc : $\varphi_{T \leftarrow S} = \varphi_{S \leftarrow S} = 1$.

Connaissant l'activité cumulée, l'énergie émise par désintégration et la masse moyenne de chaque organe ou de la tumeur, la dose moyenne absorbée par chaque organe et par la tumeur a pu être calculée.

3. Etude de l'efficacité anti-tumorale du traitement

L'objectif de cette étude est de comparer l'efficacité thérapeutique d'anticorps radiomarqués au ^{213}Bi sur la croissance tumorale d'une RIT IP classique à une RIT flash.

Protocole expérimental

L'efficacité des ^{213}Bi -AcM a été évaluée sur des souris porteuses de xénogreffe IP de cellules AN3CA. Ces cellules n'étant pas couplées à la luciférase, un suivi de la croissance tumorale par imagerie n'est donc pas possible. Pour cela les souris seront sacrifiées à des temps

différents et les tumeurs récupérées. Une courbe de croissance pourra ainsi être tracée en fonction du temps (jours). Deux anticorps ont été utilisés : l'AcM 16F12 et le rituximab comme anticorps non spécifique. Deux groupes comportant chacun 12 souris seront traités en RIT flash au ^{213}Bi -16F12 (1 groupe traité pendant 30 minutes avec une activité de 12,5 MBq) et un autre groupe avec une activité de 37 MBq (37MBq/mg). Pour la RIT IP, 12 souris ont été traitées avec une activité de 12,5 MBq. L'anticorps irrélevant (^{213}Bi -rituximab) est utilisé en RIT flash à des activités de 12,5 MBq et 37 MBq.

Des groupes contrôles ont été également traités en RIT flash et RIT IP classique en injectant du NaCl. Les premiers sacrifices se font à J11 post traitement (J22 après la greffe), et un autre sacrifice se fera à J30 (J41 après greffe). Une souris atteignant un point limite défini (perte de poids supérieure à 20% du poids initial, isolement, dos vouté etc.) est immédiatement sacrifiée. Un suivi hématologique et une mesure pondérale des souris seront assurés tout au long de l'expérimentation.

4. Etude de la toxicité du traitement

Le prélèvement du sang a été fait de la même façon que lors de l'étude biochimique après la RIT au ^{212}Pb . Ici, seulement l'analyse de la numération formule sanguine (NFS) sera évaluée. Pour cela, l'analyseur d'hématologie Scil Vet[®] abc sera utilisé. 12 μL du sang prélevé chez la souris sont prélevés dans un tube EDTA et par pipetage automatique, l'échantillon sanguin est analysé (90 secondes). Si le volume sanguin est respecté, jusqu'à 17 paramètres peuvent être mesurés :

- **Globules blancs** : Lymphocytes, Monocytes, Polynucléaires éosinophiles et Granulocytes
- **Globules rouges** : Hémoglobine (Hb), Hématocrite (Ht), Volume Globulaire Moyen (VGM), Teneur Globulaire Moyenne en Hb (TCMH), Concentration Corpusculaire Moyenne en Hb (CMH), le pourcentage de l'Indice de Répartition des globules rouges (IDR%)
- **Plaquettes** : Volume moyen Plaquettaire (VMP)



Figure 45 : analyseur d'hématologie Scil Vet[®] abc utilisé dans le cadre de l'étude de la NFS.

Un suivi pondéral des souris traitées a été réalisé.

Résultats

I. Expérimentations *in vitro*

Dans la première partie de ce projet, nous avons évalué *in vitro* la contribution des effets ciblés et non-ciblés d'une RIT alpha ou Auger dans l'efficacité biologique observée après traitement de carcinomes péritonéaux de petite taille (2 – 3 mm).

La RIT alpha a été réalisée avec les radionucléides ^{212}Pb et ^{213}Bi couplés à des AcM internalisants ou non, et la RIT Auger avec ^{125}I . L'efficacité biologique de chaque RIT a été évaluée en exposant les cellules donneuses à différentes concentrations d'AcMs radiomarqués. La survie cellulaire a par la suite été mesurée et reliée à la dose moyenne d'irradiation délivrée au noyau. La dose a été déterminée par l'approche du MIRD cellulaire. Le niveau de formation des lésions ADN radio-induites a ensuite été mesuré puis les mécanismes impliqués dans les effets bystander étudiés.

A. Survie exprimée en fonction de l'activité volumique

Les cellules A431_{CEA-Luc} et SK-OV-3_{AMHR11} ont été respectivement traitées avec des ^{212}Pb -AcMs (35A7, trastuzumab et PX) et ^{213}Bi -AcMs (12G4, 16F12, et rituximab). La RIT s'est déroulée sur 90 min avec des activités volumiques de 0 – 0,5 MBq/mL. Les cellules traitées (cellules donneuses) ont été incubées après la RIT avec du milieu frais pendant 2h. Ce milieu dit milieu conditionné (CM) a été transféré sur des cellules non irradiées (cellules receveuses). Au bout de 12 jours, les colonies formées ont été comptées à la fois chez les cellules donneuses et receveuses et la survie exprimée en fonction de l'activité volumique testée sur les cellules donneuses.

Pour les cellules A-431_{CEA-Luc} traitées avec le ^{212}Pb , une forte cytotoxicité est observée avec les anticorps spécifiques (Figure 46 A). A 0,5 MBq/mL, la survie obtenue avec le ^{212}Pb -35A7 est $< 0,001\%$ et pour le ^{212}Pb -trastuzumab elle est $< 0,009\%$. Une cytotoxicité importante est observée avec l'anticorps non spécifique ^{212}Pb -PX. Après transfert du CM, on observe également une diminution de la survie des cellules receveuses. La survie de ces cellules ayant reçu le CM est de $57,33 \pm 11,17\%$, $28,16 \pm 4,57\%$ et de $47,41 \pm 6,58\%$ respectivement pour le ^{212}Pb -35A7, le ^{212}Pb -trastuzumab et le ^{212}Pb -PX (Figure 46 A panel de droite).

La même observation est faite avec les cellules donneuses SK-OV-3_{AMHR11} traitées au ^{213}Bi , où la survie à 0,5MBq/mL diminue jusqu'à $13,9 \pm 1,2\%$ et $14,2 \pm 1,3\%$ pour le ^{213}Bi -12G4 et le ^{213}Bi -16F12, respectivement (figure 46 B panel de gauche). L'anticorps non spécifique ^{213}Bi -rituximab est également accompagné d'une forte cytotoxicité directe car la survie est de $16 \pm 0,8\%$. Quant à la survie clonogénique des cellules receveuses correspondante, elle n'est plus que de $62,1 \pm 6,4\%$, $81,3 \pm 13,7\%$ et $68,9 \pm 4,5\%$ respectivement pour les différents anticorps ^{213}Bi -12G4 ^{213}Bi -16F12 et ^{213}Bi -rituximab (Figure 46 B panel de droite). Ces résultats démontrent que, quelle que soit la localisation de l'anticorps (internalisant ou pas), on observe toujours la présence d'effets non ciblés.

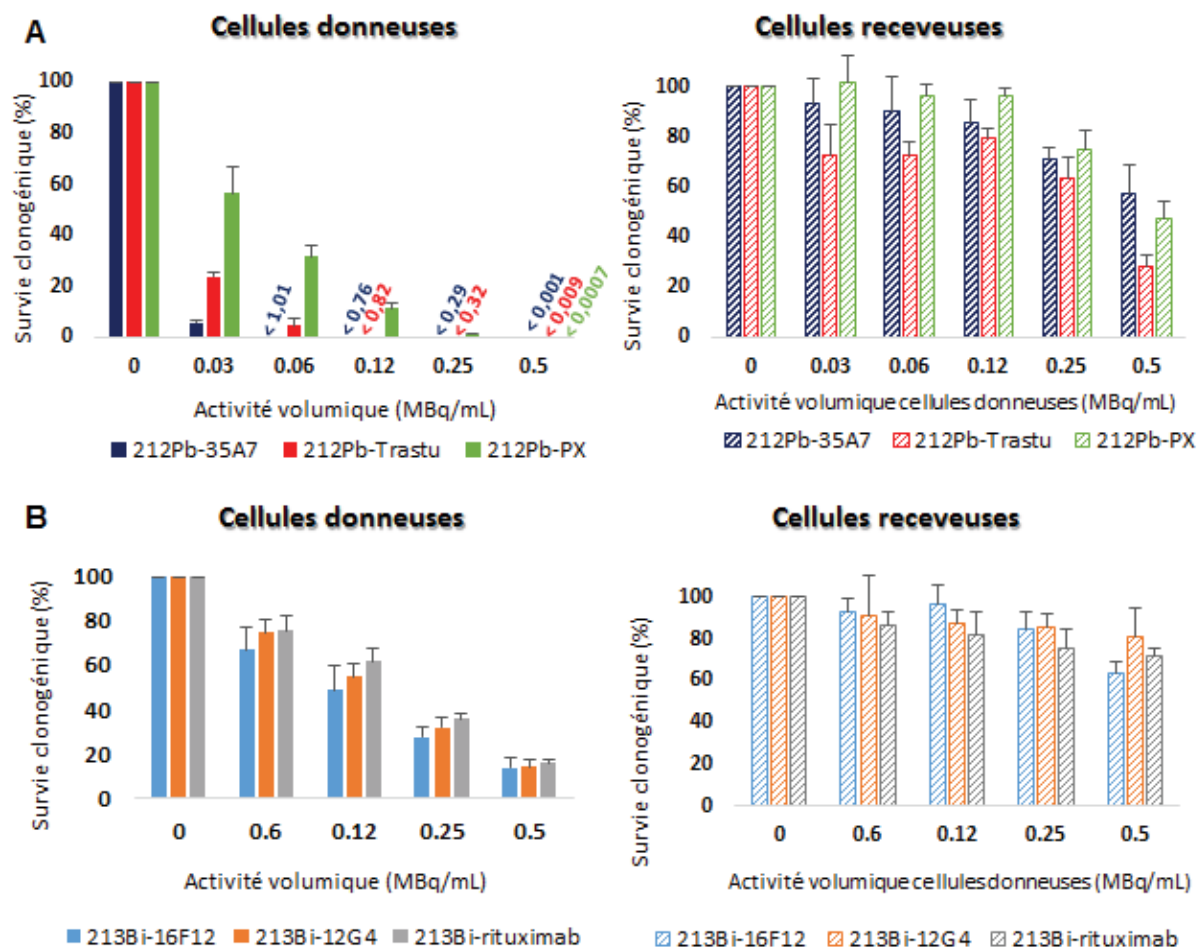


Figure 46 : survie exprimée en fonction de l'activité volumique après (A) RIT au ^{212}Pb sur les cellules A-431_{CEA-Luc} et (B) RIT au ^{213}Bi sur les cellules SK-OV-3_{AMHRII}.

Afin d'évaluer la part de l'effet des anticorps nus (non radiomarqués) dans les survies observées, le même test a été réalisé en utilisant des anticorps non radiomarqués incubés pendant le même temps de traitement soit 90 min. Les concentrations utilisées variaient entre 0 – 27 µg/mL. Aucun effet des anticorps non radiomarqués n'a été mis en évidence sur la survie des deux lignées A-431_{CEA-Luc} et SK-OV-3_{AMHRII} (Figure 47).

Dans notre méthodologie, il est à retenir que les cellules donneuses sont aussi des cellules receveuses car elles subissent également les effets cytotoxiques des substances libérées par les cellules exposées. La figure 48 présente ainsi la contribution des effets ciblés (effet direct des RI) et des effets non ciblés (bystander) dans la survie cellulaire globale obtenue après la RIT au ^{212}Pb . Le pourcentage des effets non ciblés est obtenu en soustrayant de la survie obtenue après RIT, celle obtenue des cellules receveuses. Ainsi on observe dans le cadre de la RIT au ^{212}Pb pour chaque anticorps, que le maximum d'effets non ciblés obtenus à 0,25 MBq/mL est ≤ 30%. On peut donc en conclure que dans la RIT alpha au ^{212}Pb , les effets ciblés contribuent à plus de 70% dans la mort des cellules.

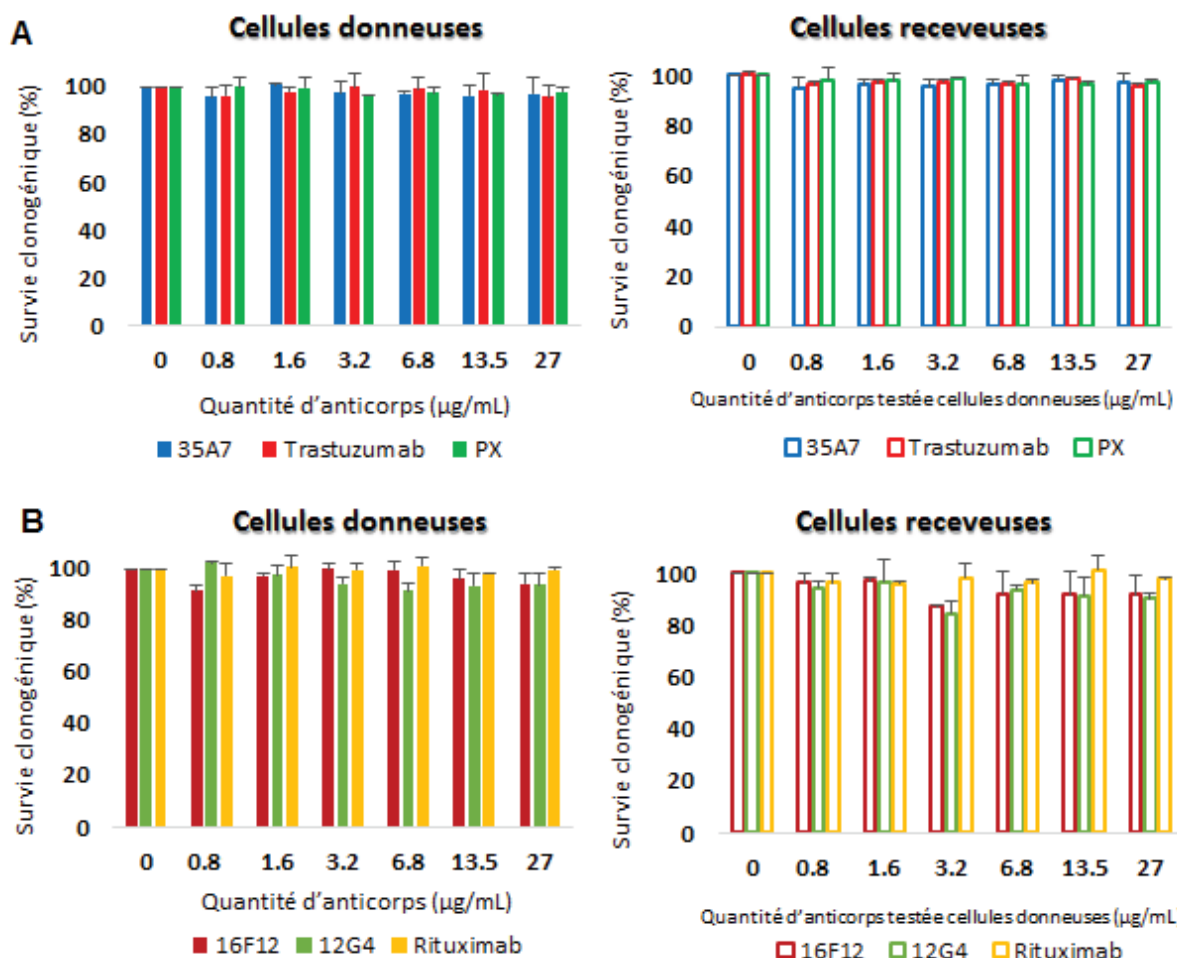


Figure 47 : survie exprimée en fonction de la concentration d'anticorps non radiomarqués (A) Traitement des cellules A-431-CEA-Luc et (B) Traitement des cellules SK-OV-3_{AMHRII}.

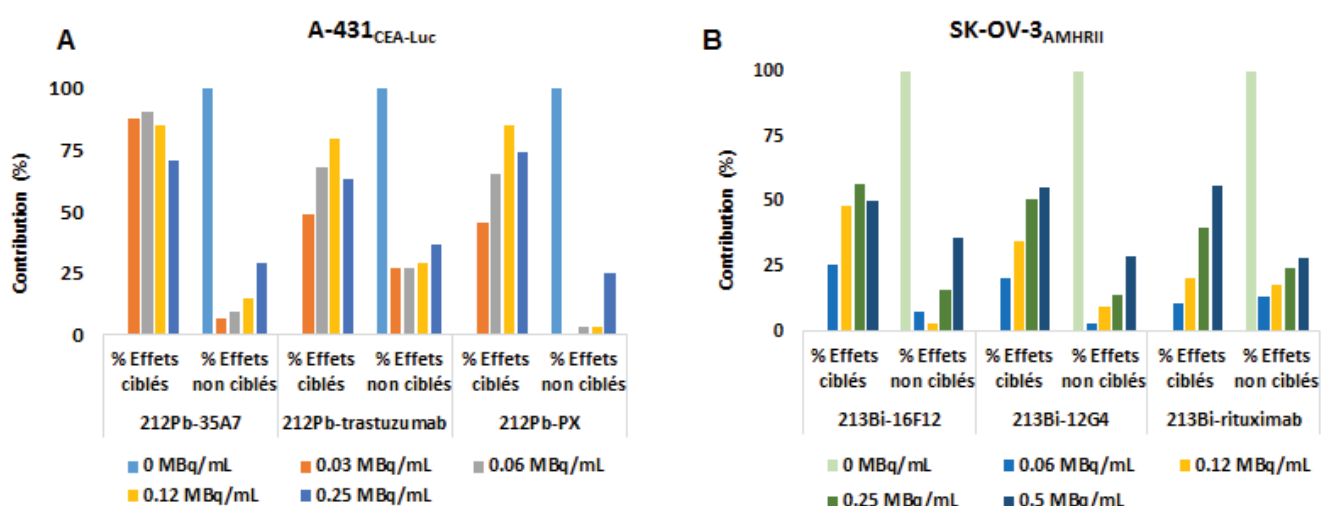


Figure 48 : contribution des effets ciblés et non ciblés de la RIT alpha sur la survie des cellules. (A) Cellules A-431_{CEA-Luc} traitée au ²¹²Pb ; (B) cellules SK-OV-3_{AMHRII} traitées au ²¹³Bi.

De même pour les cellules SK-OV-3_{AMHRII} traitées en RIT au ²¹³Bi, on observe que la part des effets ciblés est moins importante comparée à la RIT du ²¹²Pb (elle est supérieure à 50% mais ≤ à 70). Par contre la contribution des effets non ciblés semble être la même (25 – 30% dans les deux cas).

Concernant la RIT Auger, la survie clonogénique des cellules HCT 116 p53^{+/+} traitées à 4 MBq/mL avec les anticorps ¹²⁵I-35A7 et ¹²⁵I-m225 a diminué jusqu'à 58 ± 2,5% et 57,8 ± 7% respectivement. Ces valeurs sont statistiquement différentes (p<0,001) des valeurs obtenues avec l'anticorps non spécifique ¹²⁵I-PX (Figure 49). Le rôle de la protéine p53 a également été évalué en réalisant la même expérience sur les cellules HCT 116 p53^{-/-}. Dans cette lignée, on observe aussi une diminution de la survie avec les anticorps spécifiques (54,6 ± 1,2% et 56,5 ± 1,9% respectivement). De même, la survie obtenue avec l'anticorps non spécifique est statistiquement différente de celle observée avec les anticorps spécifiques. Le résultat montre qu'aucune toxicité n'est observée avec l'anticorps non spécifique, comme avec les anticorps non radiomarqués à l'¹²⁵I.

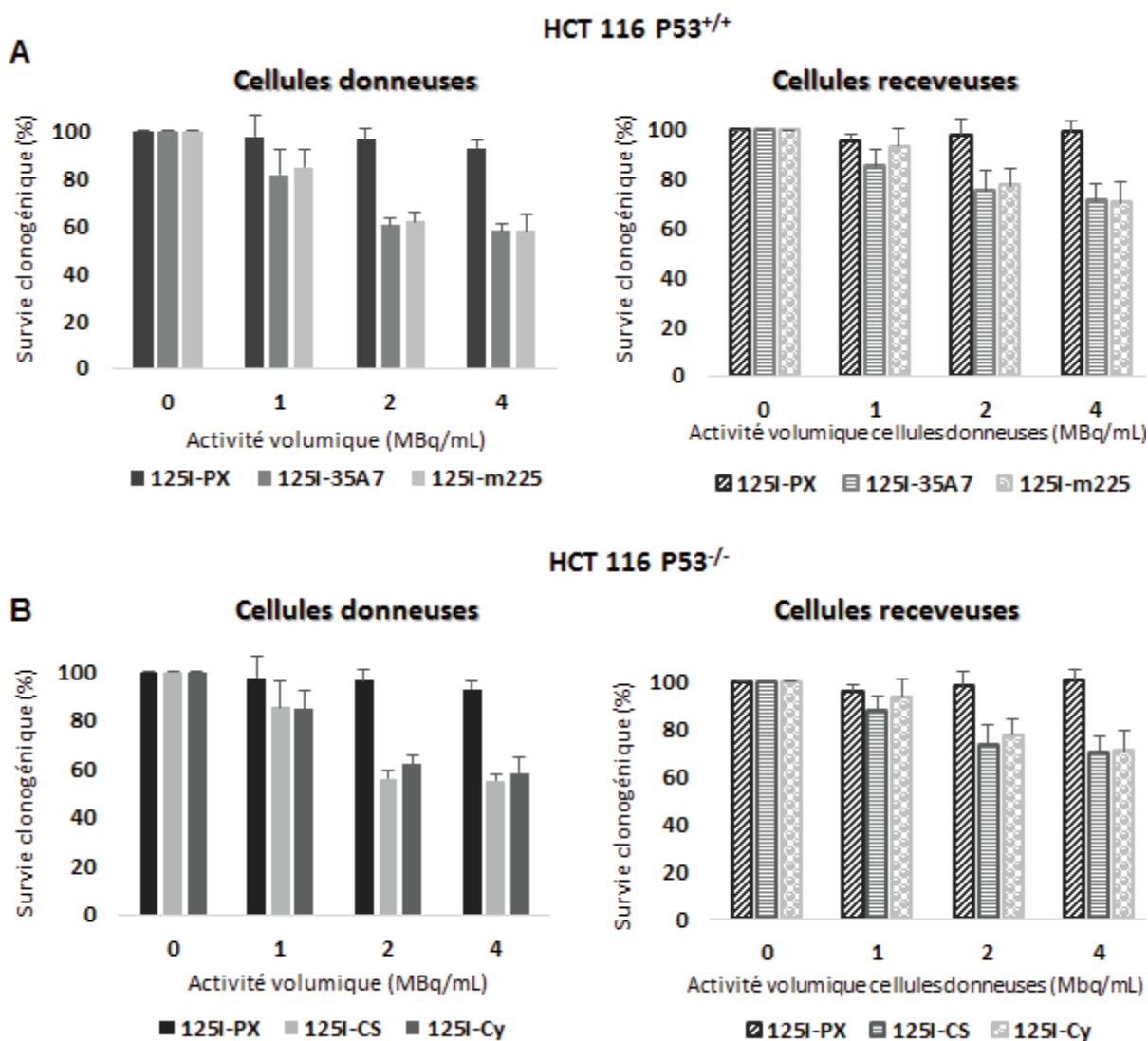


Figure 49 : survie clonogénique des cellules HCT 116 p53^{+/+} (A) et HCT 116 p53^{-/-} traitées avec en RIT à l'¹²⁵I.

Le transfert du CM sur les cellules receveuses induit également une réduction importante de la survie. La survie diminue jusqu'à $71,2 \pm 7\%$ pour les cellules receveuses HCT 116 p53^{+/+} ayant reçu le surnageant issu de la RIT ¹²⁵I-35A7 et de $70,6 \pm 8,4\%$ pour le surnageant issu de la RIT ¹²⁵I-m225. De même pour les cellules receveuses HCT 116 p53^{-/-}, la survie diminue jusqu'à $73,3 \pm 5,6\%$ et $74,5 \pm 5,1\%$ respectivement. Aucune toxicité n'est observée avec le surnageant issu de la RIT ¹²⁵I-PX sur les deux lignées ou celui issu du traitement avec des anticorps nus (non radiomarqués à l'¹²⁵I). Ces résultats suggèrent que l'effet observé est spécifique et qu'il requiert donc une fixation des ¹²⁵I-AcM à la surface des cellules.

En tenant compte des survies respectives obtenues après la RIT à l'¹²⁵I, la contribution des effets ciblés avec l'anticorps non internalisant ¹²⁵I-35A7 est $\leq 13,2\%$ ($42\% - 28,8\%$) et $\leq 12,8\%$ ($42,2\% - 29,4\%$) pour l'anticorps internalisant ¹²⁵I-m225. Par ailleurs, nous avons aussi démontré que lorsque l'¹²⁵I est couplé à l'UdR (¹²⁵I-UdR) pour cibler directement le noyau, la part des effets ciblés est $\leq 50,7\%$. Ces données confirment donc la forte cytotoxicité de l'¹²⁵I quand il est incorporé dans l'ADN.

En résumé, les effets ciblés sont plus importants que les effets non ciblés dans la survie cellulaire suite à un traitement par RIT alpha, alors que c'est l'inverse qui est observé en RIT Auger (Figure 50). Néanmoins quand c'est le noyau qui est directement ciblé par les électrons Auger, ce sont les effets ciblés qui prédominent dans la survie cellulaire finale. La cytotoxicité des effets non ciblés reste la même avec les électrons Auger quel que soit la cible c'est-à-dire la membrane avec les ¹²⁵I-AcM ou le noyau avec l'UdR.

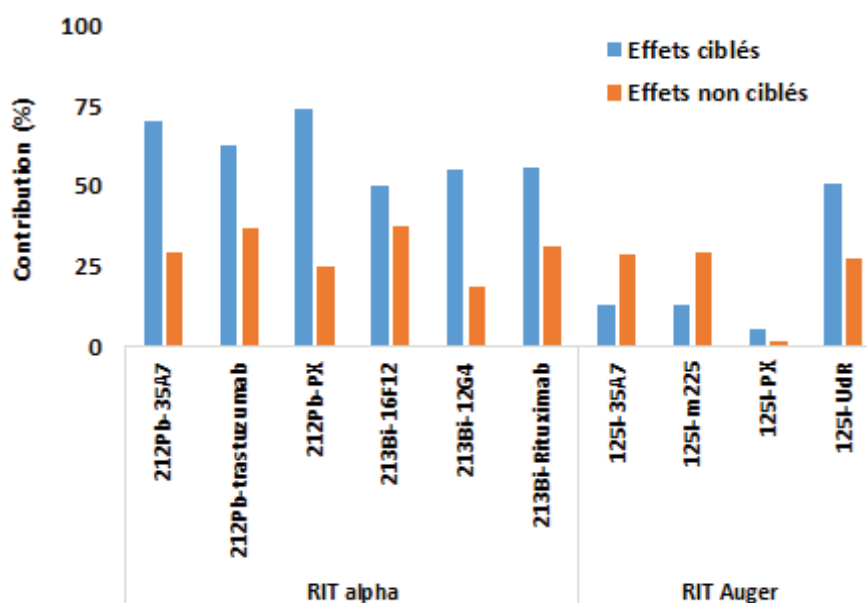


Figure 50 : contribution des effets ciblés et non ciblés dans le cadre d'une RIT alpha ou Auger.

B. Activité incorporée dans les cellules

Si l'on considère que l'atteinte nucléaire conditionne le devenir de la cellule, il est intéressant d'exprimer la survie clonogénique en fonction de la dose moyenne d'irradiation reçue par le noyau. Cette dose délivrée au noyau a été déterminée en utilisant le formalisme du MIRD cellulaire qui définit la dose selon la formule suivante : $D = \tilde{A}rs \times S$; où $\tilde{A}rs$ est l'activité cumulée dans la cellule pendant la durée de l'expérience (nombre de désintégrations (Bq.s)) et le facteur S l'énergie déposée (Gy/Bq.S) dans une cible par nombre de désintégrations.

Le calcul de $\tilde{A}rs$ s'est faite en déterminant l'activité incorporée (Bq/cellules) dans les cellules A-431_{CEA-Luc} et SK-OV-3_{AMHRII} après la RIT alpha sur un temps total de 72 h pour la RIT au ²¹²Pb et 5 h pour la RIT du ²¹³Bi. A différents temps après l'addition du vecteur radiomarqué, les cellules ont été récoltées et comptées à l'aide d'une cellule KOVA. Le nombre de cellules compté a été exprimé en fonction du temps pour chaque concentration en vecteur radiomarqué (Figure 51).

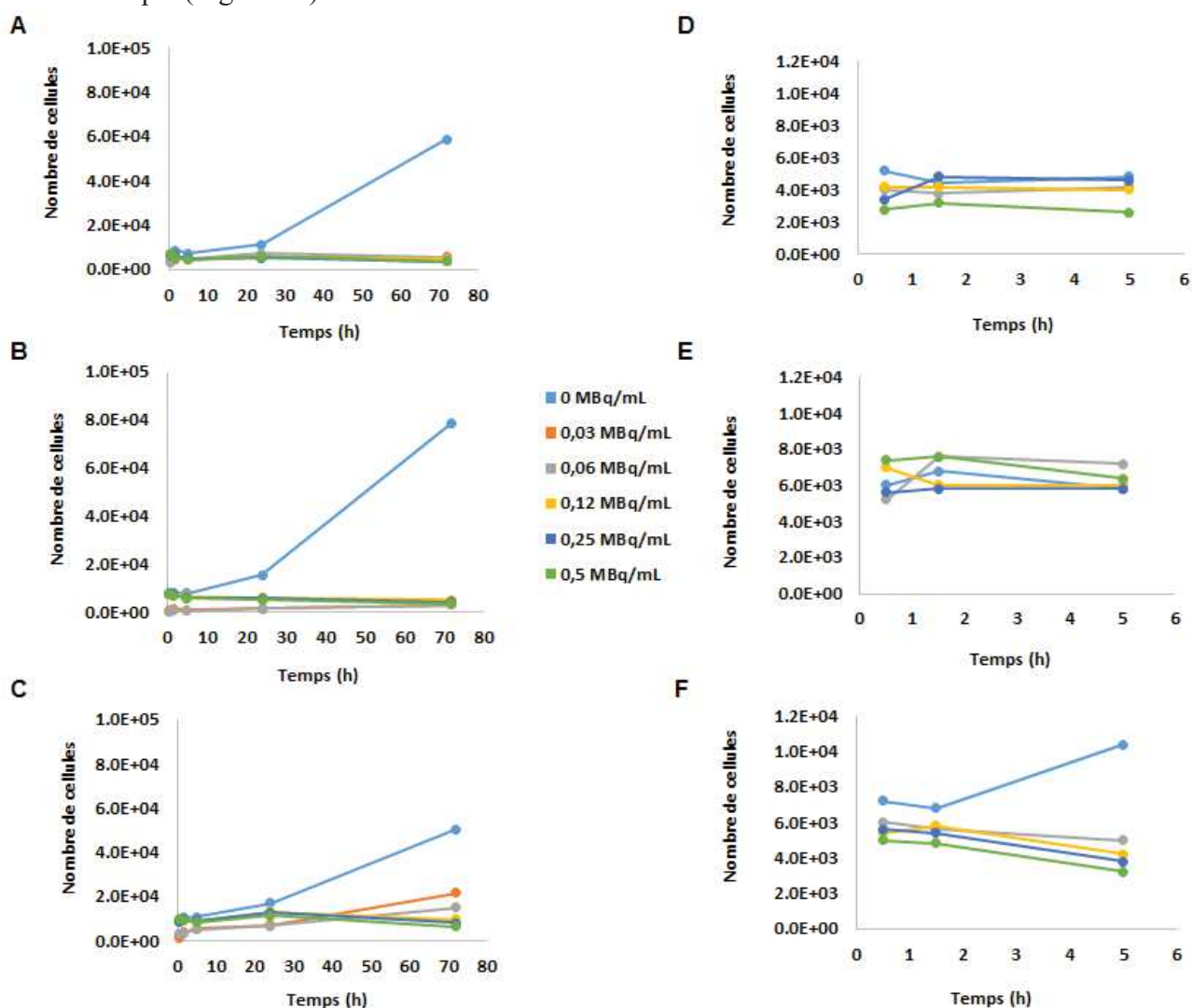


Figure 51 : numération cellulaire des deux lignées utilisées : (A – C) cellules A-431_{CEA-Luc} traitées au ²¹²Pb-35A7, ²¹²Pb-trastuzumab et ²¹²Pb-PX respectivement ; (D – F) cellules SK-OV-3_{AMHRII} traitées au ²¹³Bi-16F12, ²¹³Bi-12G4 et ²¹³Bi-PX.

On observe pour chacune des lignées une augmentation exponentielle du nombre de cellules non traitées. Pour les cellules traitées avec les anticorps spécifiques couplés au ^{212}Pb , une forte diminution de la numération cellulaire est observée durant toute la période d'étude. L'anticorps non spécifique réduit également la survie des cellules, avec un léger départ de prolifération observé au bout de 24h. Pour les cellules traitées avec les ^{213}Bi -AcM, un ralentissement de la croissance cellulaire est aussi observé mais nettement moins prononcé par rapport aux ^{212}Pb -AcM.

Après la numération cellulaire, l'activité incorporée dans les cellules a été déterminée comme le montre la figure 53 qui est une moyenne de trois expérimentations pour chacune des lignées traitées.

L'activité incorporée dans les cellules pour chacun des anticorps utilisés augmente en fonction de l'activité volumique. L'incorporation maximum est atteinte à $t = 1,5$ h (90 min) et à $t = 5$ h, l'activité restante est presque divisée par 2. Ainsi pour l'anticorps ^{212}Pb -35A7 l'activité incorporée maximale obtenue pour la plus faible activité (0,03 MBq/mL) est de 0,009 Bq/cellule et atteint 0,05 Bq/cellule à 0,5 MBq/mL. A 5h l'activité à 0,5 MBq/mL passe à 0,01 Bq/cellule. Pour le ^{212}Pb -trastuzumab, l'activité incorporée maximale à 0,03 MBq/mL est de 0,001 Bq/cellule et atteint 0,007 Bq/cellule à 0,5 MBq/mL. Au bout de 5h elle n'est plus que de 0,003 Bq/cellule. Pour l'anticorps non spécifique, des valeurs plus faibles sont obtenues.

La différence significative d'activité incorporée entre les deux anticorps spécifiques peut s'expliquer par la différence d'expression antigénique des récepteurs CEA (ciblé par l'AcM 35A7) et HER2 (cible du trastuzumab) à la surface des cellules A-431_{CEA-Luc}. Cette expression antigénique a été évaluée par cytométrie en flux (Figure 52).

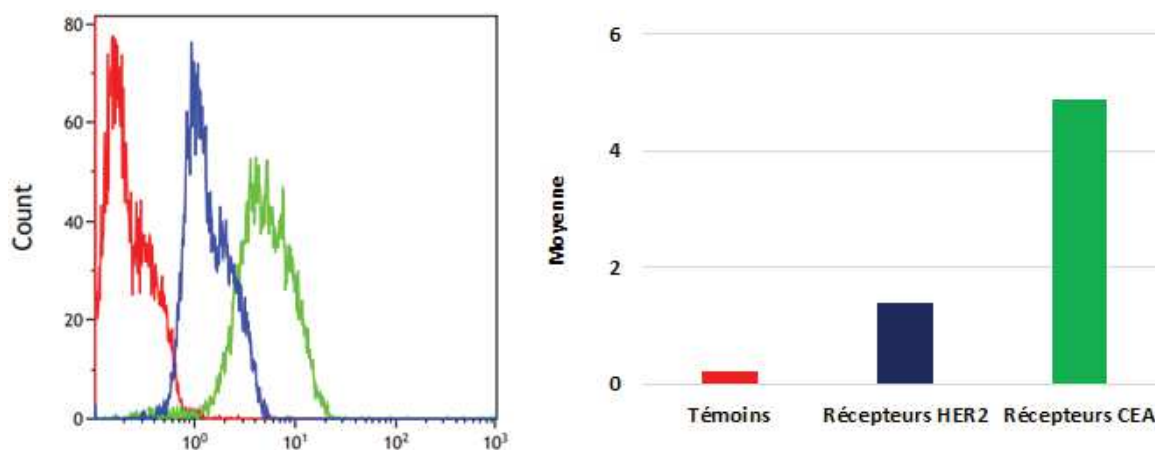


Figure 52 : taux d'expression du CEA (vert) et de HER2 à la surface des cellules A-431_{CEA-Luc}.

En ce qui concerne l'activité incorporée dans les cellules SK-OV-3_{AMHRII} traitées avec les anticorps couplés au ^{213}Bi , on observe également qu'elle augmente avec l'activité volumique testée. L'activité maximale est obtenue au bout de 0,5h (30 min) dans les cellules et après 5h, la presque totalité de l'activité a été éliminée. L'activité maximale

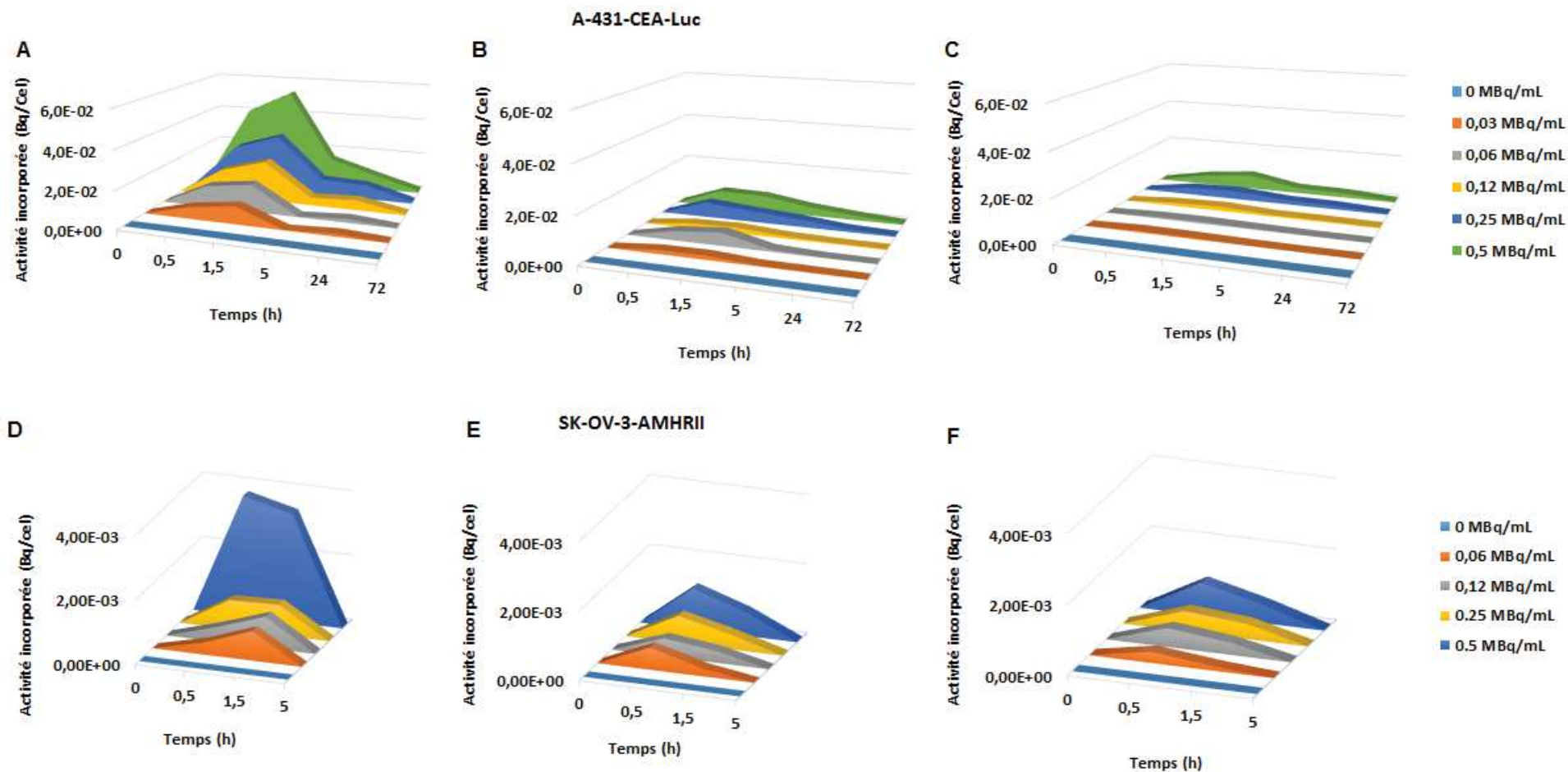


Figure 53 : activité incorporée par cellule (Bq/cellule) en RIT alpha. (A – C) Cellules A-431_{CEA-Luc} traitées respectivement avec le ²¹²Pb-35A7, le ²¹²Pb-trastuzumab et le ²¹²Pb-PX. (D – E) Cellules SK-OV-3_{AMHR11} traitées respectivement avec le 213Bi-16F12, 213Bi-12G4 et le 213Bi- rituximab.

obtenue est de 0,009, 0,003 et 0,001 Bq/cellule respectivement pour le ^{213}Bi -16F12, ^{213}Bi -12G4 et le ^{213}Bi -rituximab (Figure 53, D – F).

Pour chacune des activités volumiques étudiées, le nombre total de désintégrations par cellule ($\tilde{\text{Ars}}$) a ensuite été calculé en mesurant les aires sous les courbes précédemment obtenues par la méthode des trapèzes (Figures 55). Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau 12.

Tableau 12 : valeurs des activités cumulées (en Bq.s/cellule) obtenues pour chacun des différents anticorps utilisés lors de la RIT au ^{212}Pb ou au ^{213}Bi .

	Lignée A-431 _{CEA-Luc}			Lignée SK-OV-3 _{AMHR11}		
	^{212}Pb -35A7	^{212}Pb -trastuzumab	^{212}Pb -PX	^{213}Bi -16F12	^{213}Bi -12G4	^{213}Bi -Rituximab
0 MBq/mL	0	0	0	0	0	0
0.03 MBq/mL	281,9	67,5	14,7	-	-	-
0.06 MBq/mL	419,3	107,9	23,5	7	3,6	1,9
0.12 MBq/mL	1120,7	152,5	151,9	9,8	4,1	4,4
0.25 MBq/mL	1695,3	411,6	364,9	11,8	5,5	5,9
0.5 MBq/mL	2239,6	546	458,9	36,7	8,7	6,6

On observe qu'à 0,03 MBq/mL, le ^{212}Pb -35A7 produit 282 désintégrations par cellule contre 68 et 15 pour le ^{212}Pb -trastuzumab et l'anticorps non spécifique ^{212}Pb -PX respectivement. A la plus forte activité, on observe jusqu'à 2000 désintégrations par cellule pour l'anticorps non internalisant (^{212}Pb -35A7) ce qui explique le pourcentage de survie plus faible obtenu avec cet anticorps. En effet, à 0,06 MBq/mL (419 désintégrations/cellule) la survie obtenue est < 1% (Figure 46A panel de gauche) alors que pour l'anticorps internalisant (^{212}Pb -trastuzumab), la survie obtenue est de 5% pour 108 désintégrations/cellule. Pour l'anticorps non spécifique, la survie est de 32% (23,5 désintégrations/cellules).

Des nombres de désintégrations beaucoup plus faibles sont obtenues avec le ^{213}Bi . Pour les cellules SK-OV-3_{AMHR11} traitées en RIT au ^{213}Bi , l' $\tilde{\text{Ars}}$ mesurée est de 6,6, 8,7 et 36,7 Bq.s/cellule respectivement pour le ^{213}Bi -Rituximab, le ^{213}Bi -12G4 et le ^{213}Bi -16F12 et ce à la plus forte des activités.

A partir des valeurs d'activité cumulée, la dose moyenne reçue par le noyau des cellules irradiées pourra ainsi être déterminée.

C. Mesure des lésions l'ADN

La particularité des émetteurs de fort TEL, est qu'ils produisent une forte densité d'ionisation sur un faible parcours. Leur localisation dans ou à proximité de la molécule d'ADN peut donc conduire à des dommages irréversibles pouvant entraîner la mort de la cellule. L'efficacité de la RIT alpha et Auger a donc été évaluée en mesurant deux marqueurs d'atteintes biologiques de l'ADN à savoir les foci γ -H2AX (cassure double brin de l'ADN) et 53BP1 (signalisation et réparation des cassures double brin de l'ADN).

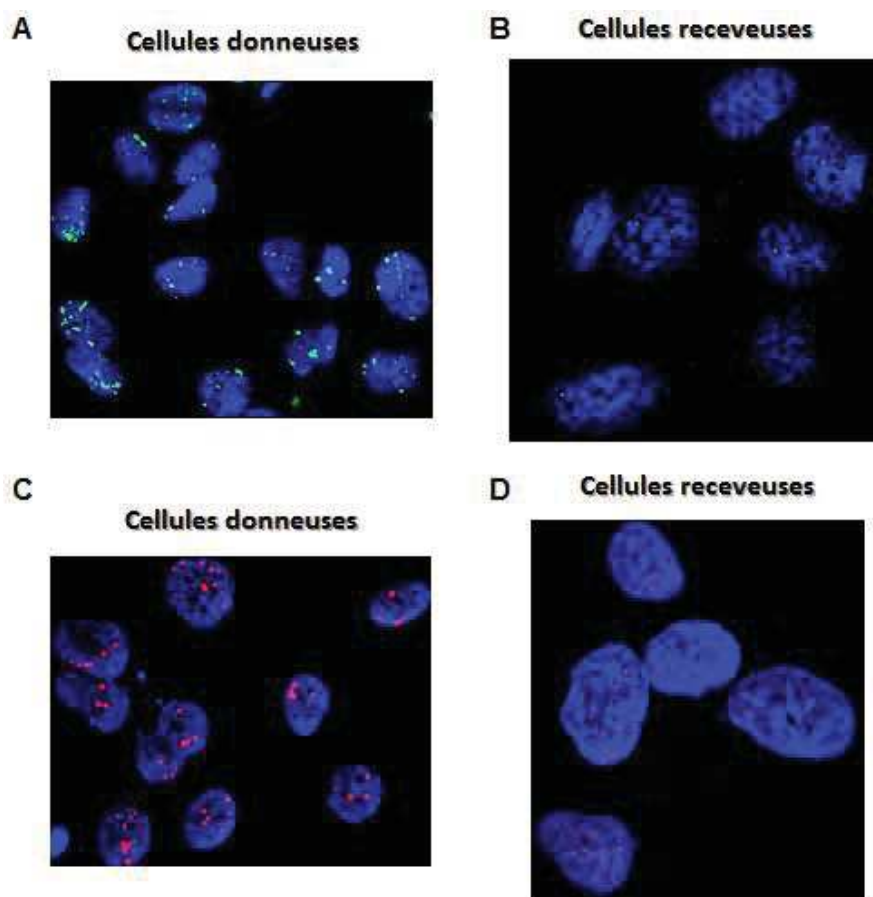


Figure 54 : marquage des foci γ -H2AX (A – B) et 53BP1 (C – D) sur les cellules SK-OV-3AMHRII traitées par RIT au ^{213}Bi -16F12.

Sur la figure 54 on observe dans les cellules SK-OV-3AMHRII donneuses traitées avec les ^{213}Bi -AcM la formation de foci γ -H2AX et 53BP1. La trace des particules alpha est ainsi observée dans certaines cellules à travers la formation de cassures doubles brins très rapprochées formant une ligne droite. Ces foci sont également visibles, bien qu'en nombre moins important, dans les cellules receveuses témoignant ainsi de la présence d'effets non ciblés dans les cellules non irradiés. Le nombre moyen de foci γ -H2AX et 53BP1 a été évalué (Figure 55). Chaque comptage a été effectué sur au moins 100 cellules pour les différents anticorps utilisés. Dans les cellules donneuses par exemple, le nombre moyen de foci γ -H2AX formé est 5 – 6 fois plus grand que dans les cellules non traitées et pour les cellules receveuses il est 3 fois plus grand. Le nombre moyen de foci 53BP1 formés dans les cellules irradiées par

comparaison aux cellules contrôles est 13 fois plus grand dans les cellules donneuses et 2,5 fois plus grand dans les cellules receveuses.

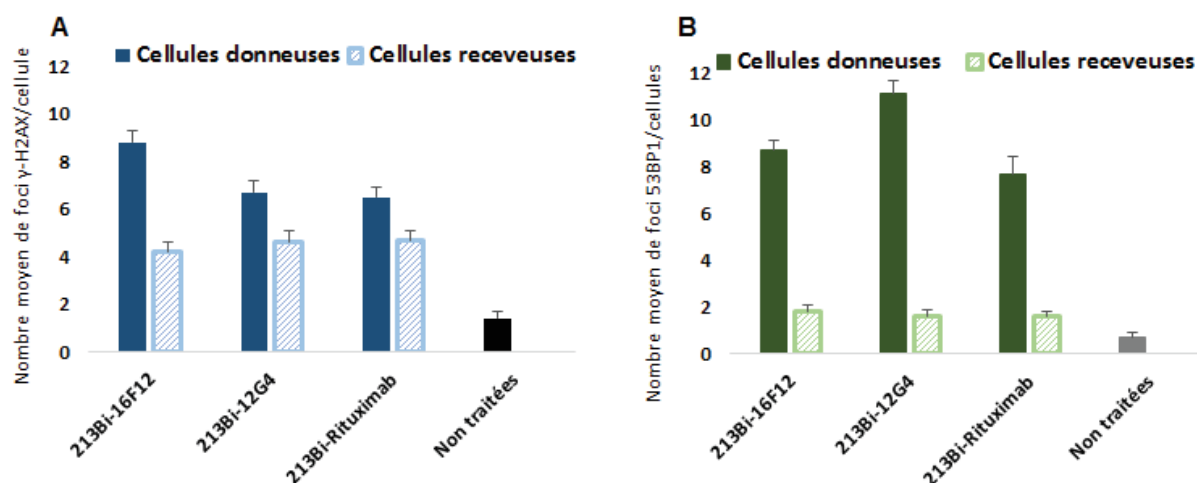


Figure 55 : nombre moyen de foci γ -H2AX (A) et 53BP1 (B) comptés après RIT au ^{213}Bi des cellules SK-OV-3_{AMHR11}.

Ce qui est particulièrement important de noter est que l'on observe dans les cellules donneuses que les foci peuvent être arbitrairement différenciés selon leur taille en gros, moyen et petits foci comme illustré sur la figure 56 et dans le tableau 13. Dans les cellules receveuses, seul de petits foci sont observés. Les gros foci seraient produits par des rayonnements de haut TEL et correspondraient donc à des lésions complexes, tandis que les petits foci qui sont de simples lésions seraient issus du stress oxydatif chronique.

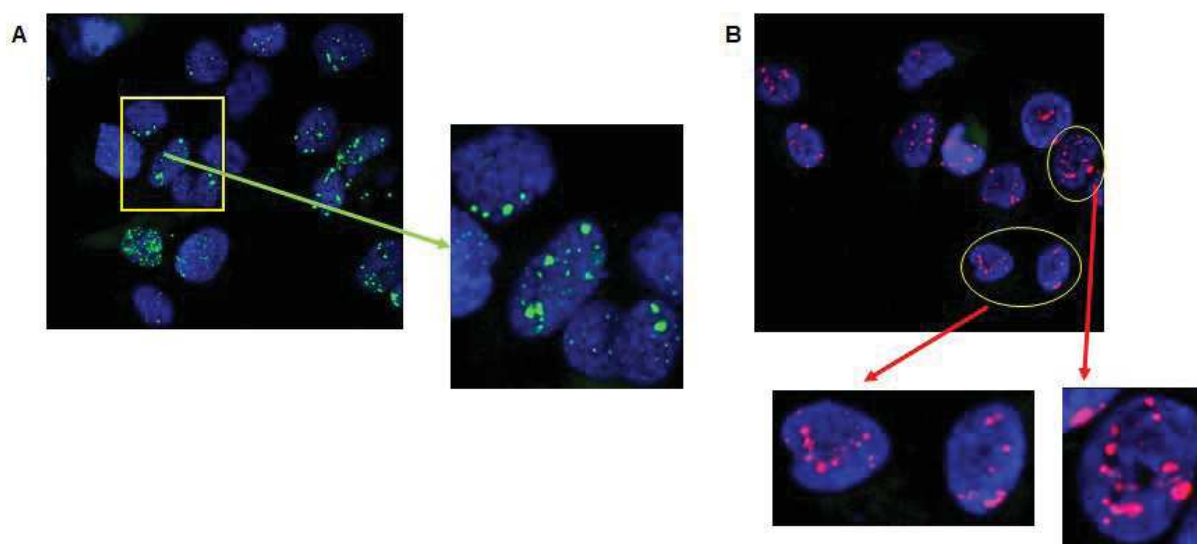


Figure 56 : schéma montrant les différentes tailles de foci γ -H2AX (A) et 53BP1 (B) observés dans les cellules donneuses SK-OV-3_{AMHR11} après RIT au ^{213}Bi .

Comme montré dans le tableau 12, la taille des gros foci est 4 supérieure à celle des petits foci et les moyens foci ont une taille 2 fois supérieure à celle des petits foci.

Tableau 13 : mesures de la taille des foci γ -H2AX / 53BP1 dans les cellules SK-OV-3_{AMHRII} traitées en RIT au ²¹³Bi

Ratio taille des foci	γ -H2AX	53BP1
Gros/Petit	4,4	4,6
Moyen/Petit	2,6	2,3
Gros/Moyen	1,7	2

La figure 57 montre la distribution des foci γ -H2AX et 53BP1 dans les cellules donneuses et receveuses en fonction de leurs tailles. On observe dans les cellules donneuses, que le nombre de gros et moyen foci γ -H2AX formés après traitement avec les anticorps spécifiques est supérieur au nombre formé suite au traitement avec l'anticorps non spécifique. Il est en de même pour la formation des foci 53BP1. Quel que soit le marqueur analysé, seuls de petits foci sont observés dans les cellules receveuses.

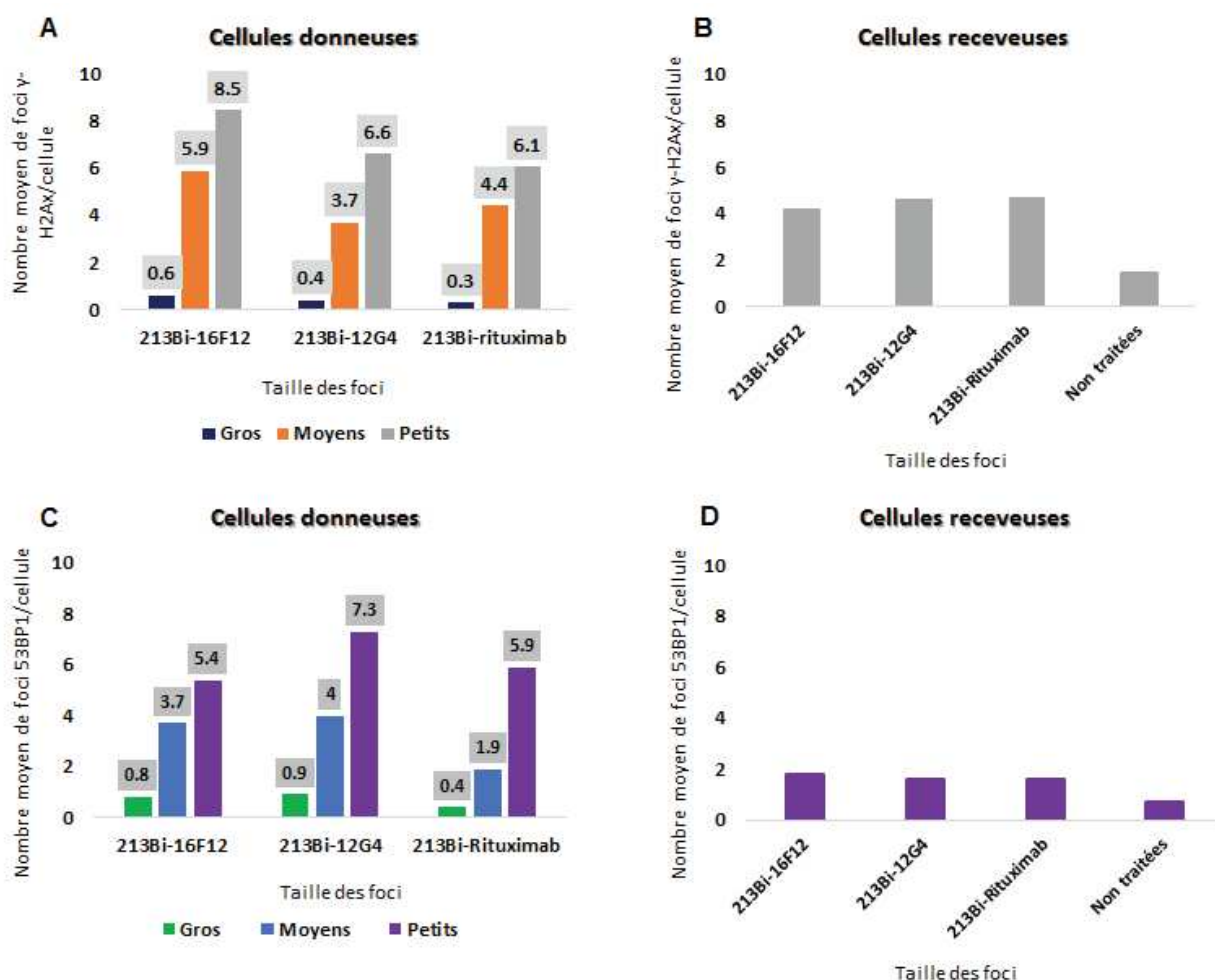


Figure 57 : distribution des foci γ -H2AX et 53BP1 selon leur taille dans les cellules SK-OV-3_{AMHRII} traitées par RIT au ²¹³Bi.

Pour les cellules A-431_{CEA-Luc} traitées avec les ²¹²Pb-AcM, on observe également la formation de foci 53BP1 dans les cellules donneuses mais aussi dans les cellules filles. Malgré de nombreuses tentatives et adaptations du protocole, nous n'avons pas réussi à effectuer le marquage des foci γ -H2AX dans cette lignée. Le nombre moyen de foci 53BP1 dans les cellules donneuses est de 4 – 5 fois plus que dans les cellules non traitées et dans les cellules receveuses, il est de 2 fois plus.

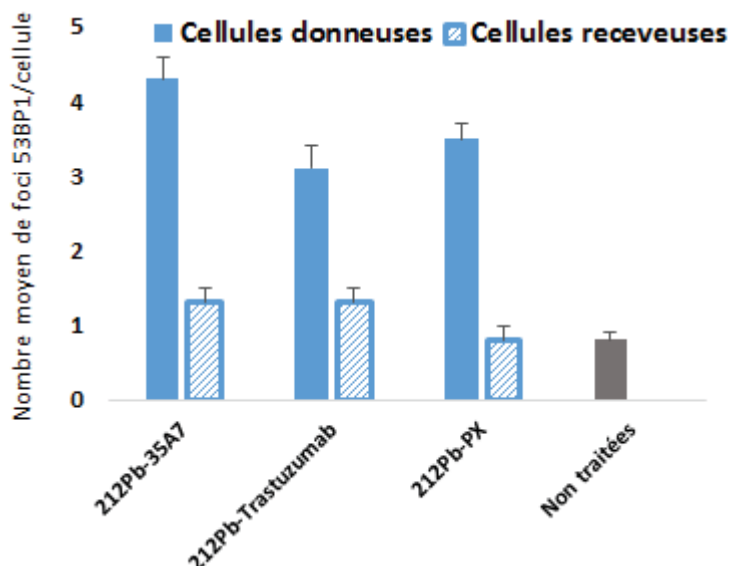


Figure 58 : nombre moyen de foci 53BP1 comptés dans les cellules A-431_{CEA-Luc} après la RIT au ²¹²Pb.

La mesure des foci γ -H2AX a également été évalué après la RIT Auger sur les cellules HCT 116 p53^{+/+} et HCT 116 p53^{-/-}. Comme dans la RIT avec les particules α , on observe la formation de foci γ -H2AX dans les cellules donneuses et receveuses. Toutes les cellules donneuses traitées avec les anticorps spécifiques (¹²⁵I-35A7 et ¹²⁵I-m225) présentaient des foci contre seulement 25% pour les cellules donneuses traitées avec l'anticorps non spécifique ¹²⁵I-PX. Dans les cellules contrôles, seulement 10% présentaient des foci γ -H2AX. Les cellules receveuses traitées avec le CM des cellules donneuses présentaient également toutes, la formation de foci γ -H2AX (figure 59).

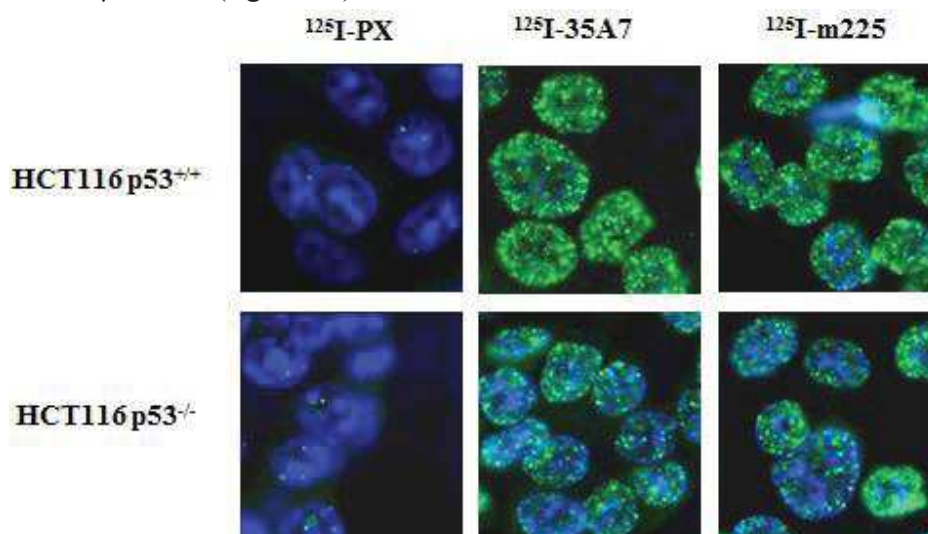


Figure 59 : formation des foci γ -H2AX dans les cellules HCT 116 après RIT à l'¹²⁵I.

D. Mesure des micronoyaux

Les micronoyaux (MN) sont des entités indépendantes de la cellule qui sont éliminées au moment de la mitose et qui contiennent des portions d'ADN. Il s'agit donc d'un bon indicateur de l'atteinte de l'ADN mal ou non réparé. La formation de micronoyaux participe à la mort mitotique.

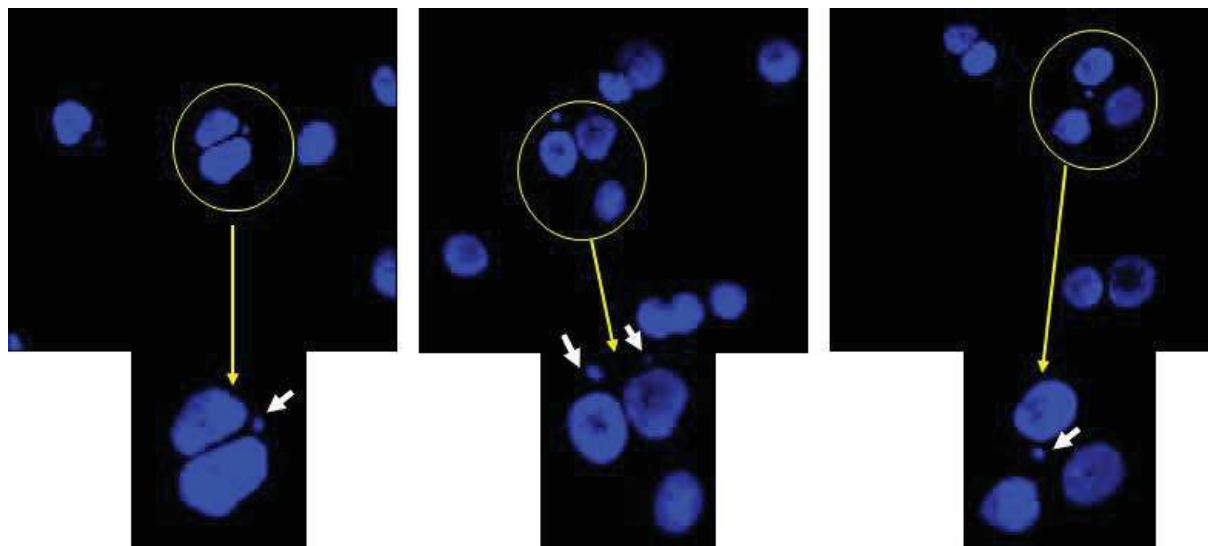


Figure 60 : micronoyaux observés sur les cellules A-431_{CEA-Luc} traitées en RIT au ²¹²Pb.

L'estimation de la formation de MN consécutive à un traitement de RIT au ²¹²Pb (0,5 MBq/mL, 90 min) a été mesurée en calculant le ratio de micronoyaux par cellule binucléée (MN/BN). Ce ratio a pour avantage de différencier les MN se formant dans les cellules en mitose (en division). Les expérimentations ont été réalisées avec les trois anticorps radiomarqués au ²¹²Pb (35A7, trastuzumab et PX). Pour chaque type de traitement, au moins 500 cellules ont été comptées.

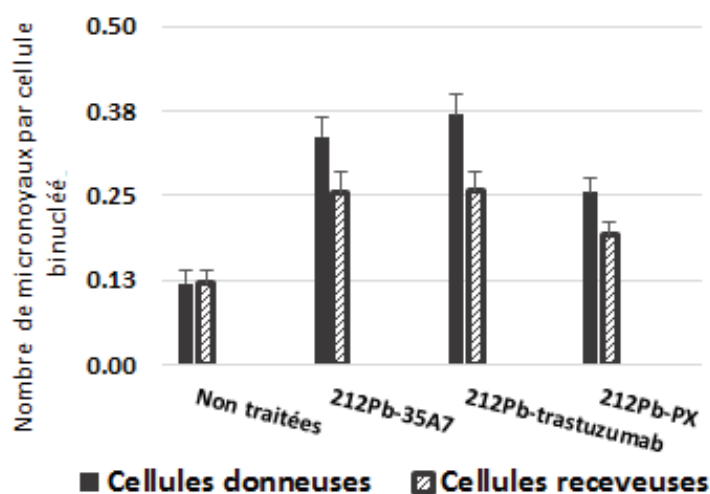


Figure 61 : nombre de micronoyaux par cellules binucléées observés sur les cellules A-431_{CEA-Luc} donneuses et receveuses après traitement de RIT avec les ²¹²Pb-AcM.

On observe la présence de MN dans les cellules donneuses et receveuses. Le nombre de MN/BN varie de $0,12 \pm 0,02$ (cellules non traitées) à $0,34 \pm 0,03$ (^{212}Pb -35A7) et $0,37 \pm 0,03$ (^{212}Pb -trastuzumab) dans les cellules donneuses. Dans les cellules receveuses, ce nombre est de $0,26 \pm 0,03$ pour les deux anticorps spécifiques. Le nombre de MN/BN obtenu pour les anticorps spécifiques est toujours supérieur à celui observé avec l'anticorps non spécifique. La distribution des MN dans les cellules donneuses et receveuses a été représentée en fonction du pourcentage de cellules binucléées.

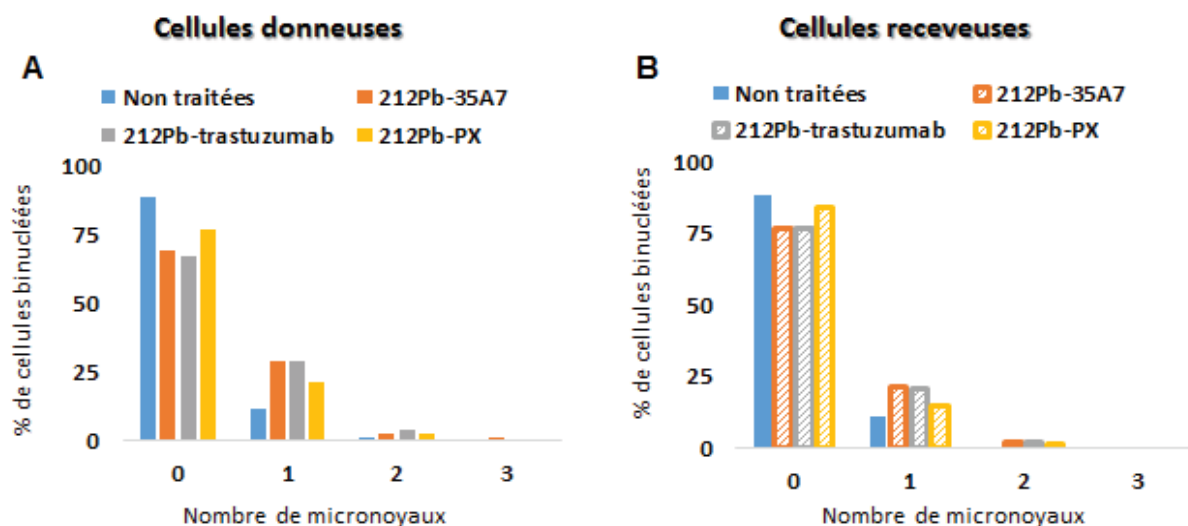


Figure 62 : nombre de micronoyaux par cellules binucléées

Dans les cellules donneuses, on observe après traitement avec les anticorps spécifiques que, 30% des cellules en division présentent 1 MN et 3% au moins 2 MN. Dans les cellules non traitées, seulement 11% des cellules en mitose présente 1 MN et 0,4% en présente 2. Pour les cellules receveuses, 20% des cellules en division ont 1 micronoyau et 2% en ont 2.

En RIT Auger, l'induction de MN a également été démontré avec les ^{125}I -AcM. Ces résultats ont déjà été publiés [401].

E. Etude des mécanismes impliqués dans les effets non ciblés

1. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

L'implication des ROS dans la médiation des effets non ciblés a été évaluée en exposant les cellules receveuses des différentes lignées utilisées au surnageant issu de cellules donneuses traitées en présence ou non d'inhibiteurs de ROS (DMSO et catalase pour la RIT ^{213}Bi ; DMSO et N-acetylcysteine (NAC)) pour la RIT Auger. La survie clonogénique a ensuite été mesurée sur les cellules donneuses et receveuses.

Dans le cadre de la RIT Auger, on observe que la survie des cellules donneuses et receveuses augmente significativement comparé à celle des cellules traitées en RIT ^{125}I en

absence de tout inhibiteur de ROS ($p < 0,001$ et $p < 0,01$ respectivement). Ce résultat suggère que, le stress oxydatif est impliqué non seulement dans les effets ciblés mais aussi dans les effets non ciblés des ^{125}I -AcM.

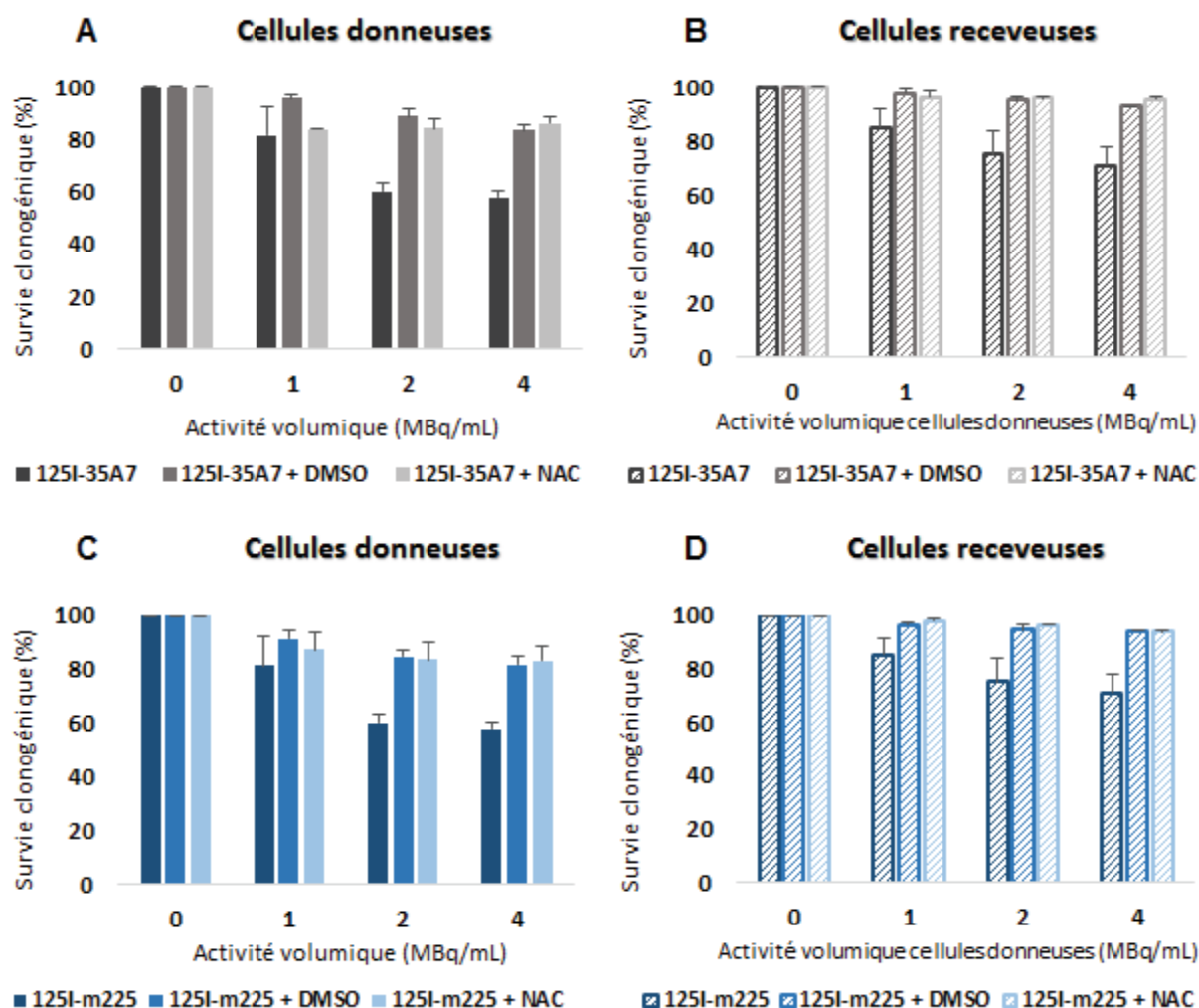


Figure 63 : mesure du stress oxydatif dans les cellules HCT 116 p53^{+/+} après RIT à l' ^{125}I . Les cellules donneuses sont traitées en présence ou en absence d'inhibiteurs de ROS puis le CM est transféré sur les cellules receveuses. (A - B) Cellules traitées avec le ^{125}I -35A7 ; (C - D) Cellules traitées avec le ^{125}I -m225.

S'agissant de la RIT alpha au ^{213}Bi , la survie des cellules donneuses est augmentée mais nettement moins que dans le cas de la RIT Auger. La survie des cellules receveuses est également restaurée. Par contre, lorsque l'on expose directement les cellules receveuses au CM en présence ou non de catalase ou de SOD, on observe une augmentation significative ($p < 0,01$) de la survie de ces cellules. Cela démontre que les ROS contribuent peu dans la cytotoxicité directe observée dans les cellules donneuses en RIT alpha. En revanche, les ROS contribuent pour une part importante dans les effets non ciblés observés sur les cellules receveuses.

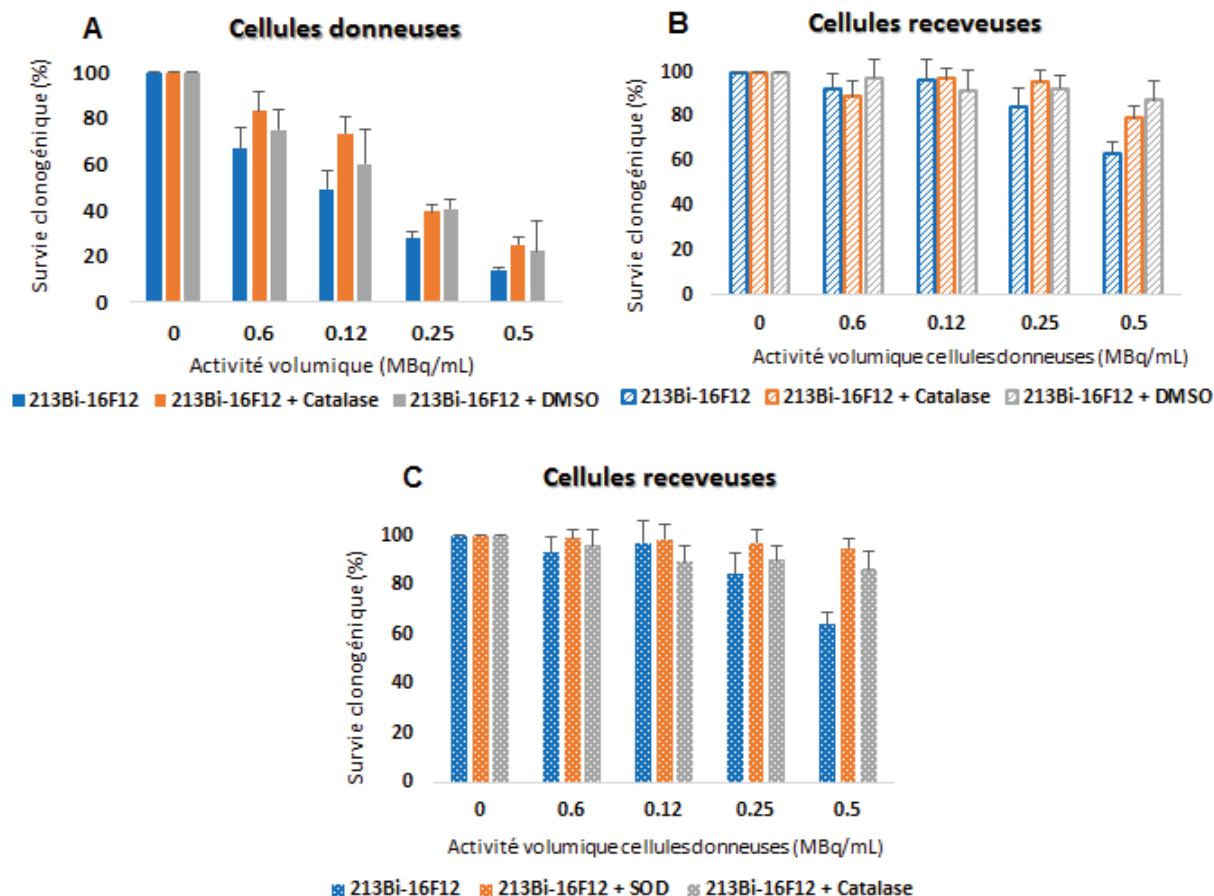


Figure 64 : mesure du stress oxydatif dans les cellules SK-OV-3_{AMHRII} après RIT au ²¹³Bi. (A) Cellules donneuses traitées en présence ou en absence d'inhibiteurs de ROS ; (B) Cellules receveuses traitées avec le CM issu des cellules donneuses ; (C) Cellules receveuses directement traitées avec le CM en présence ou en absence d'inhibiteur de ROS.

Toujours dans le but d'évaluer l'implication des ROS dans les effets non ciblés observés sur les cellules receveuses SK-OV-3_{AMHRII}, l'apoptose a été mesurée sur ces cellules traitées avec le CM pendant 24h en présence de catalase et du DMSO. Une réduction significative du taux d'apoptose est ainsi observée sur ces cellules en présence de la catalase. La présence du DMSO à 0,5 % pendant 24h sur les cellules s'est elle, avérée toxique pour les cellules.

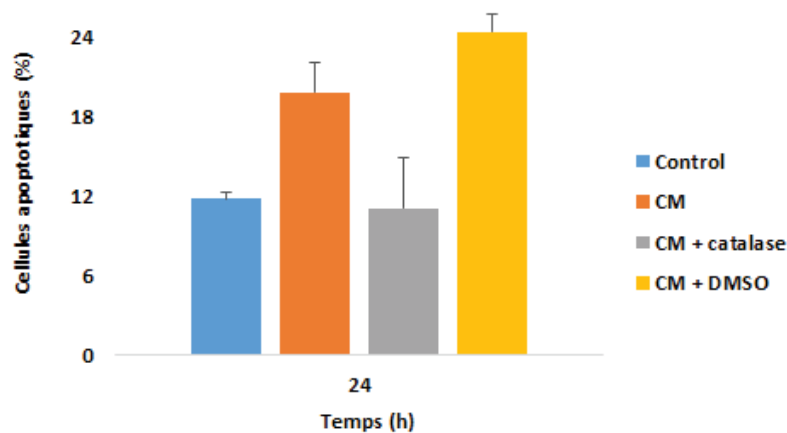


Figure 65 : mesure de l'apoptose sur les cellules receveuses traitées en présence d'inhibiteurs de ROS.

2. Rôle de la membrane plasmique

Les radeaux lipidiques sont des macro-domaines enrichis en céramide, localisés dans la membrane cellulaire et qui sont produits par hydrolyse de la sphingomyéline suite à l'activation préalable de l'acide sphingomyélinase (A-SMase). Dans le but de déterminer si les ^{125}I -AcM affectent l'organisation de la membrane cellulaire à la suite du traitement par RIT (4 MBq/mL, 48h), la formation des radeaux lipidiques a été mesurée par immunofluorescence (IF) en utilisant l'anticorps anti-choléra toxine B (CT-B) sur les cellules donneuses HCT 116 p53^{+/+}. Les résultats obtenus révèlent une augmentation de la formation des radeaux lipidiques dans les cellules traitées avec les anticorps spécifiques (^{125}I -35A7 et ^{125}I -m225) par rapport aux cellules non irradiées ou traitées avec l'anticorps non spécifique ^{125}I -PX (Figure 66A). L'analyse par cytométrie en flux a de même montré que la concentration membranaire en céramides (indiquant la formation des radeaux lipidiques) est augmentée dans les cellules traitées avec les anticorps spécifiques (Figure 66B). Egalement par IF, la co-détection de céramides et de l'apoptose (Annexin V) a été observée sur certaines cellules donneuses HCT 116 p53^{+/+}. Cependant signalons que dans une étude déjà publiée par l'équipe [402] il a été démontré que l'apoptose bien que pouvant se produire dans les effets cytotoxiques du ^{125}I -35A7, ne jouait pas un rôle déterminant.

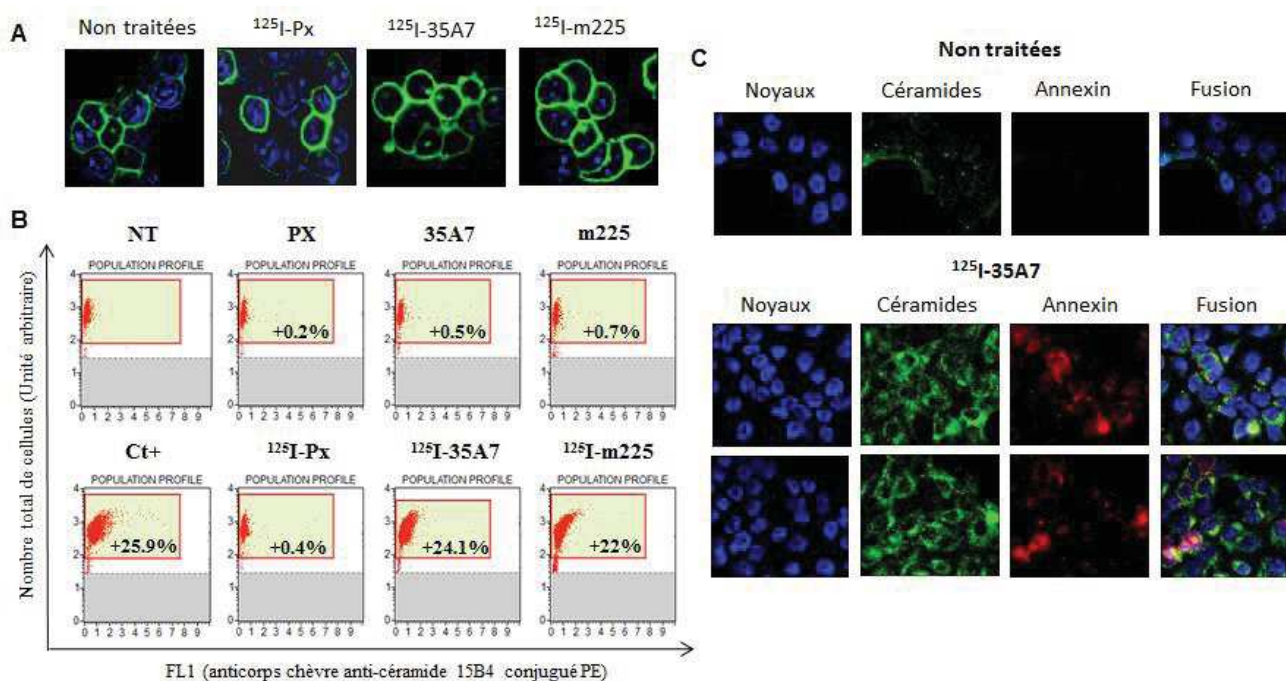


Figure 66 : mesure de la formation des radeaux lipidiques via la formation de céramides induits par l'activation de l'A-SMase sur les cellules HCT 116 p53^{+/+} traitées avec les ^{125}I -AcM [403]. (A) Détection des radeaux lipidiques par IF ; (B) Mesure des céramides par cytométrie en flux ; (C) Colocalisation des céramides et de l'annexin V.

La formation de céramide a également été confirmée par mesure de l'activité de l'A-SMase sur les cellules HCT 116 p53^{+/+}. On observe ainsi une augmentation significative de l'A-SMase dans les cellules traitées au ^{125}I -35A7 ou ^{125}I -m225 (3 fois plus par rapport aux anticorps

non radiomarqués, $p < 0,001$) (Figure 67). Nous avons aussi constaté que le niveau de la sphingosine-1-phosphate (S1P) résultant de l'hydrolyse de céramide a été fortement augmenté dans les cellules traitées (Figure 67), alors qu'aucune augmentation n'est observée dans les cellules non traitées.

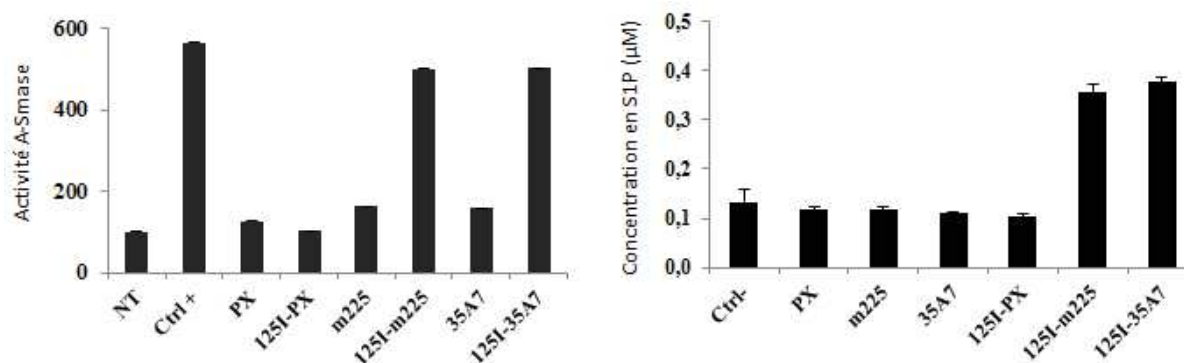


Figure 67 : mesure de l'activité de la sphingomyélinase acide et de la sphingosine-1-phosphate dans les cellules donneuses HCT 116 p53^{+/+}

Par la suite, l'implication des radeaux lipidiques dans la cytotoxicité des ¹²⁵I-AcM a été confirmée en utilisant la filipine qui désorganise la formation des radeaux lipidiques. On a ainsi pu observer qu'en présence de la filipine, la formation des radeaux lipidiques était réduite dans les cellules donneuses (Figure 68A). De même, la co-incubation des cellules donneuses avec la filipine réduit de manière significative la formation des foci γ -H2AX. Lorsque le surnageant est transféré sur les cellules receveuses, cette même diminution est observée (Figure 68B).

Enfin, la survie clonogénique des cellules donneuses et receveuses a été mesurée en présence de la filipine. La survie s'en est trouvée totalement restaurée (voir article récemment publié [403]). Une protection similaire a été assurée avec la méthyl- β -cyclodextrine (MBCD), une autre molécule également capable de désorganiser la formation des radeaux lipidiques, en enlevant le cholestérol contenu dans la membrane plasmique [403]. Ces résultats indiquent clairement que la formation des radeaux lipidiques est impliquée à la fois dans les effets ciblés et non ciblés de la RIT Auger du ¹²⁵I-AcM.

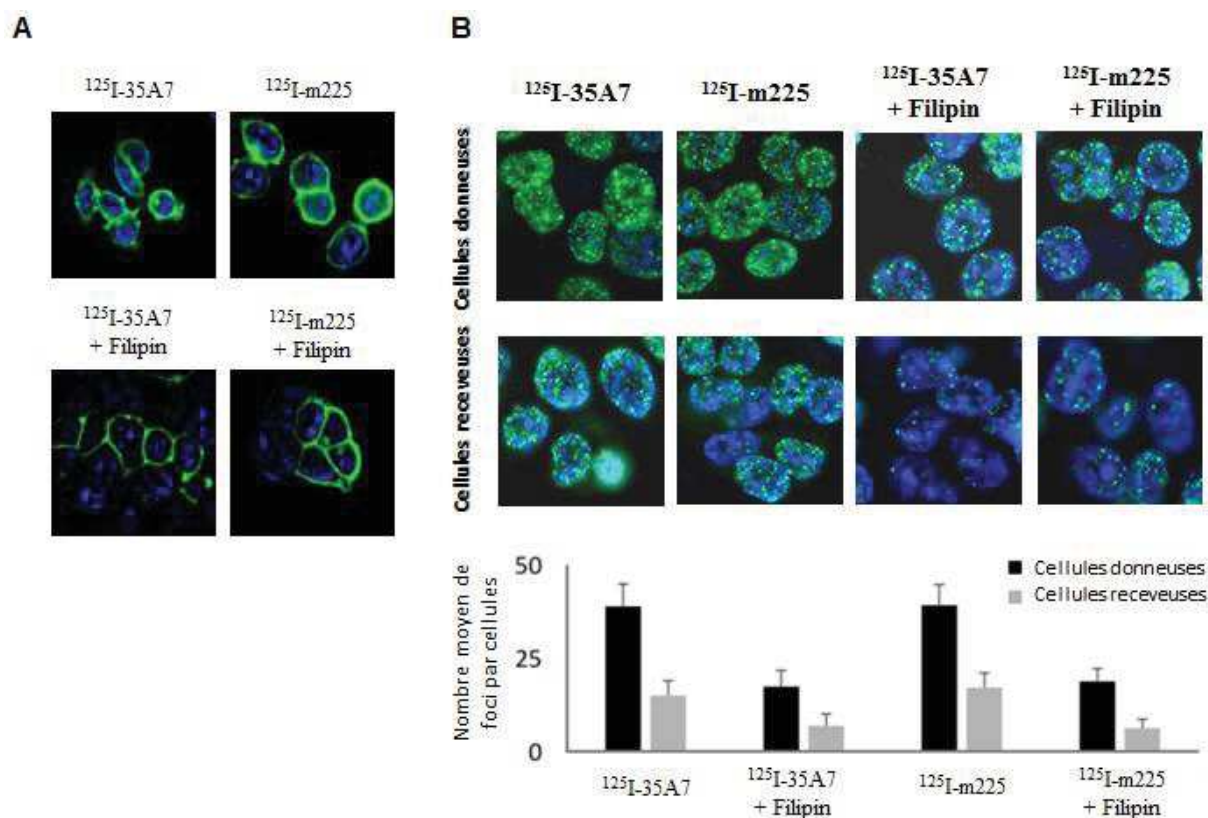


Figure 68 : rôle des radeaux lipidiques dans les effets non ciblés [403]. (A) Inhibition des radeaux lipidiques par la filipine ; (B) La formation des foci γ -H2AX dans les cellules donneuses et receveuses est réduite en présence de la filipine

L'implication des radeaux lipidiques dans l'efficacité de la RIT alpha a également été cherchée. Néanmoins, toutes les tentatives pour avoir un bon marquage par IF des radeaux lipidiques avec l'anticorps CT-B ont été infructueuses (fort marquage aspécifique compliquant l'analyse). Cela est peut-être dû aux lignées cellulaires utilisées (A-431_{CEA-Luc} pour la RIT au ^{212}Pb et SK-OV-3_{AMHRII} pour la RIT au ^{213}Bi) qui sont différentes de celle utilisée en RIT ^{125}I (HCT 116 p53^{+/+}). Pour cela par cytométrie en flux, nous avons évalué l'activité de l'A-SMase (Figure 69) qui une fois activée conduit à la formation de céramide par l'hydrolyse de la sphingomyéline.

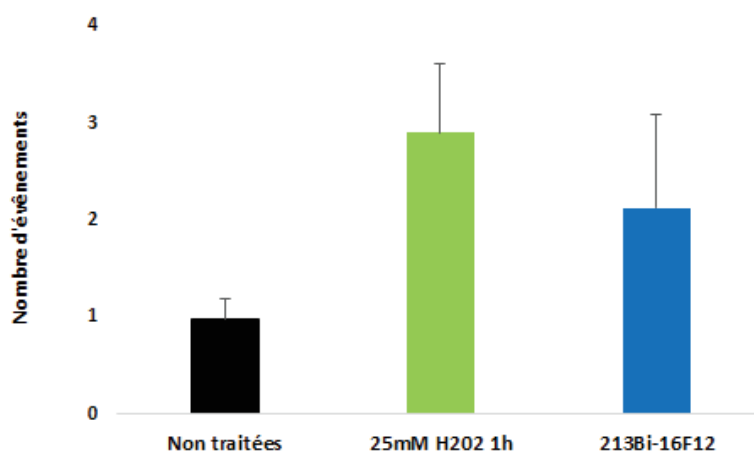


Figure 69 : mesure de l'activité de l'A-SMase dans les cellules SK-OV-3_{AMHRII} traitées en RIT au ^{213}Bi .

On observe une augmentation d'un facteur 2 au moins de l'A-SMase dans les cellules traitées avec le ^{213}Bi -16F12 comparées aux cellules non traitées. Des cellules traitées avec du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) présentent aussi une augmentation significative de l'A-SMase. Pour savoir si cette augmentation de l'activité de l'A-SMase était corrélée avec une induction de céramide, nous avons procédé à une mesure des céramides dans les cellules traitées au ^{213}Bi -16F12 en utilisant l'anticorps anti-céramide 15B4 (Figure 70). Le résultat montre que l'irradiation par les particules α induit la formation de céramide dans les cellules SK-OV-3_{AMHRII}. Cette observation à la fois de l'augmentation de l'activité de l'A-SMase ainsi que du niveau de céramide dans les cellules traitées avec le ^{213}Bi -16F12 suggère que les radeaux lipidiques pourraient aussi être impliqués dans les effets cytotoxiques observés en RIT alpha.

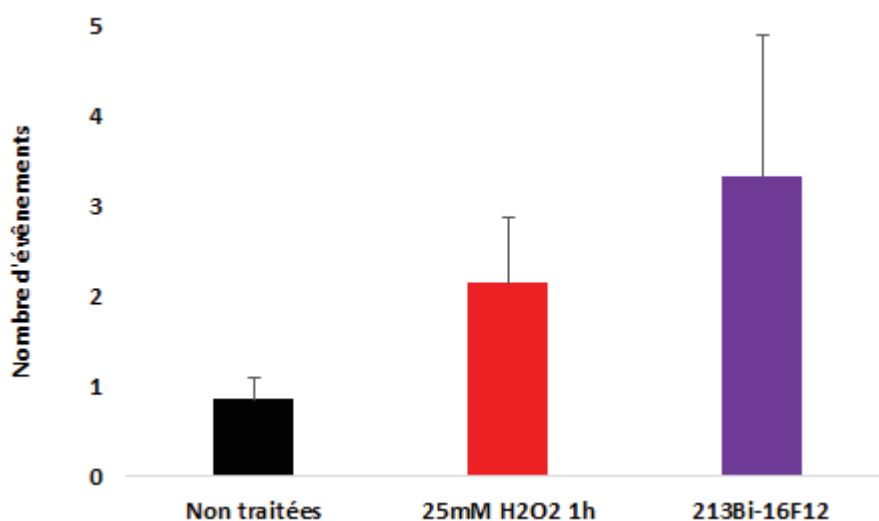


Figure 70 : mesure de la formation du céramide membranaire dans les cellules SK-OV-3_{AMHRII} traitées en RIT au ^{213}Bi .

3. Voies de signalisation impliquées dans les effets non ciblés

a. Les protéines phosphorylées

Dans le but d'identifier les voies de signalisation impliquées dans les effets non ciblés radio-induits, la phosphorylation (activation) ou non des protéines MAPKs a été évaluée par Western Blot sur les cellules donneuses et receveuses après la RIT au ^{213}Bi (Figure 71 et 72).

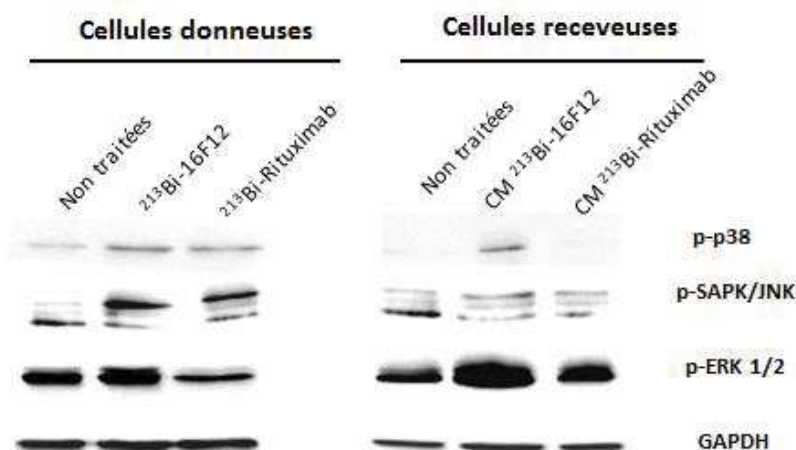


Figure 71 : les MAPK sont impliquées dans les effets bystander radio-induits dans les cellules SK-OV-3_{AMHRII} traitées en RIT ²¹³Bi.

Une augmentation significative des protéines de mort p38 et JNK est observée dans les cellules donneuses SK-OV-3_{AMHRII} traitées au ²¹³Bi. Une légère augmentation de la protéine ERK1/2 est aussi observée avec l'anticorps spécifique. Lorsque l'on transfère le CM sur les cellules non irradiées, on observe également l'activation de ces protéines. Particulièrement, une augmentation significative de ERK1/2 est observée par rapport aux cellules contrôles.

Ces résultats ont également été confirmés sur la lignée AN3CA dans les mêmes conditions de RIT.

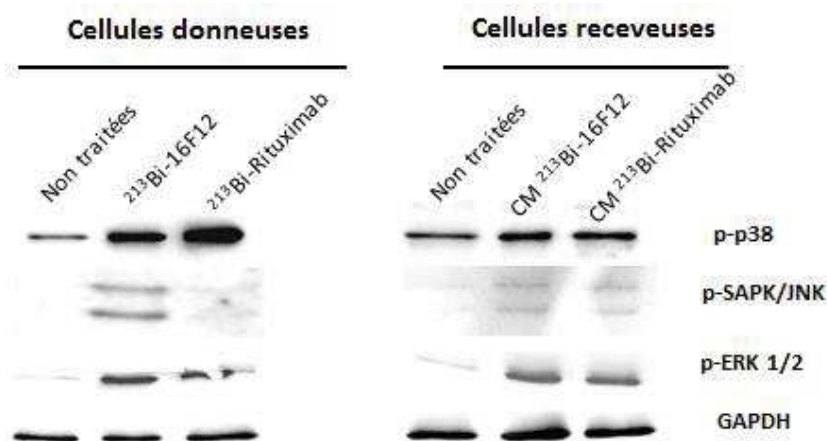


Figure 72 : activation des protéines MAPKs dans les cellules AN3CA traitées en RIT du ²¹³Bi.

Outre les protéines MAPKs, on a pu observer l'activation de la protéine AKT à la fois dans les cellules donneuses et receveuses (Figure 73).

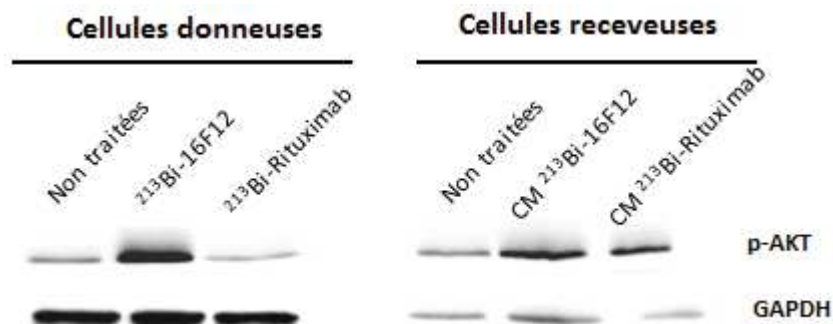


Figure 73 : la protéine AKT est activée dans les cellules SK-OV-3_{AMHRII} après traitement au ²¹³Bi.

Les protéines phosphorylées après traitement ont également été évaluées en utilisant une membrane protéomique capable de détecter l'activation de 46 kinases (Figure 74). La contribution probable de l'anticorps nu (non radiomarké) dans l'activation de ces protéines a aussi été évaluée. On observe ainsi que le 16F12 active bien les MAPK, mais beaucoup moins que lorsqu'il est radiomarké au ²¹³Bi (3 fois moins). On remarque surtout, que ce sont les voies les plus impliquées dans la survie telles que AKT et ses effecteurs en amont ou en aval: GSK-3 α/β (*Glycogen Synthase Kinase 3*) et son substrat la β -caténine, TOR, PRAS40 (*Proline-Rich Akt Substrate of 40 kDa*), qui sont les plus activées par le 16F12. En présence des rayonnements (²¹³Bi-16F12), ces protéines sont beaucoup moins activées. On observe aussi une forte activation par le 16F12, des protéines de la famille SFK (*Src Family of protein tyrosine Kinases*) à savoir Src, Yes, Fyn et Hck, mais aussi de FAK (*Focal Adhesion Kinase*) qui sont toutes des protéines pro-oncogènes. Ces protéines pro-survie sont fortement inhibées lorsque le 16F12 est radiomarké au ²¹³Bi. Par contre, la protéine c-JUN qui est une cible en aval de p38 et JNK, ainsi que STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) se voient activées à la suite du traitement avec le ²¹³Bi-16F12 (Figure 74).

L'incubation du 16F12 sur les cellules SK-OV-3_{AMHRII} ne produit pas d'apoptose ; aussi le test de prolifération réalisé sur 48h ne montre aucun retard de prolifération dû à l'anticorps 16F12 non radiomarké. Ces données confirment les résultats du 16F12 non radiomarké obtenu avec la membrane protéomique.

Sur les cellules receveuses traitées avec le CM ²¹³Bi-16F12 (Figure 75), les voies MAPK sont également activées ainsi que la protéine AKT.

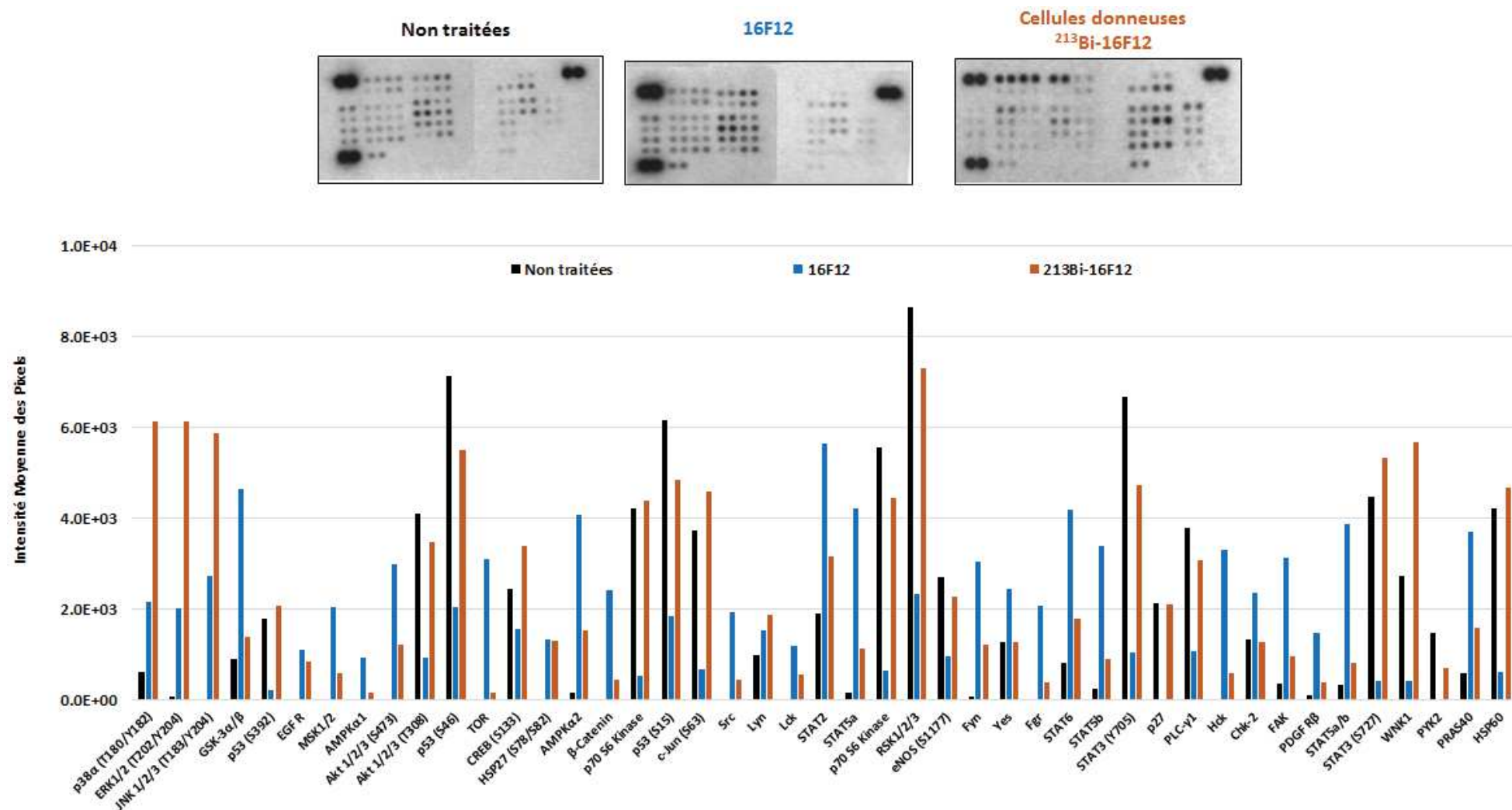


Figure 74 : voies de signalisation activées dans les cellules donneuses SK-OV-3_{AMHRI} traitées en RIT au ²¹³Bi. (Noir) cellules non traitées ; (Bleu) cellules donneuses traitées au 16F12 ; (Marron) cellules donneuses traitées ²¹³Bi-16F12.

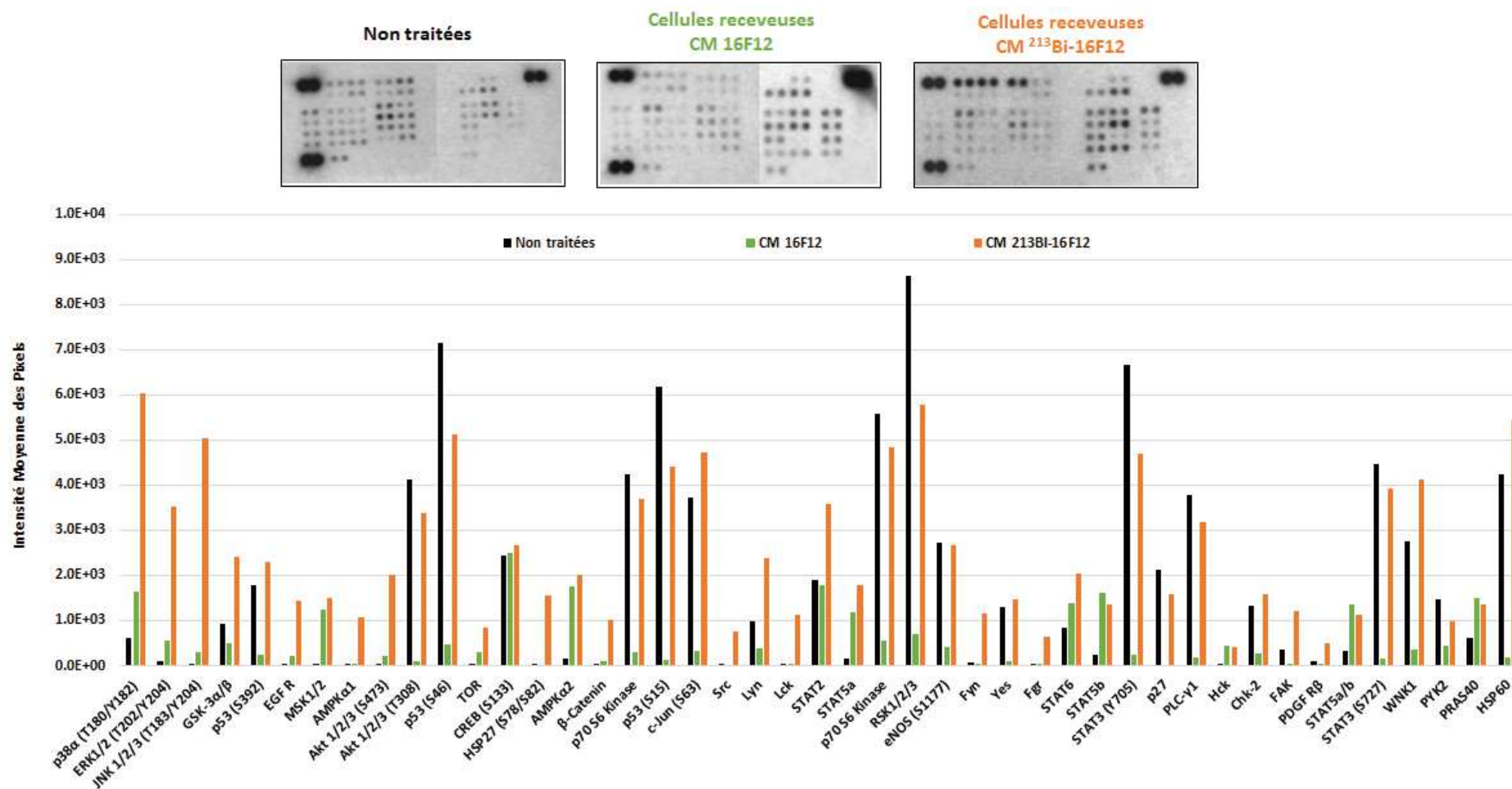


Figure 75 : voies de signalisation activées dans les cellules receveuses SK-OV-3_{AMHRII} traitées en RIT au ²¹³Bi. (Noir) cellules non traitées ; (Vert) cellules receveusestraitées CM 16F12 ; (Orange) cellules receveuses traitées CM ²¹³Bi-16F12

La membrane « phospho kinase array » a également été utilisée dans le cadre de la RIT Auger afin d'identifier les voies de signalisation activées (Figure 76). Dans les cellules traitées avec l'anticorps non radiomarqué (35A7), seulement ERK1/2 et CREB sont fortement activées. Pour l'anticorps radiomarqué, on observe que les protéines ERK1/2, AKT, p38 et JNK sont induites. Les protéines en aval de AKT incluant p70S6K (*p70S6 kinase*), GSK3, et e-NOS sont aussi activées. On peut aussi citer comme protéines activées STAT1 et 4, RSK (*90kDa ribosomal S6 kinase*), MSK (*mitogen- and stress-activated protein kinase*), CREB et c-JUN.

Il est particulièrement intéressant de noter qu'on observe l'activation des protéines qui sont impliquées dans la signalisation du calcium, ce qui n'était pas le cas avec la RIT alpha. Ces protéines impliquées dans les flux calciques sont fortement phosphorylées après exposition au ¹²⁵I-35A7. Il s'agit de : PLC- γ (*phospholipase C- γ*), PYK-2 (*proline-rich tyrosine kinase 2*) et de la protéine paxillin. Par contre lorsque les cellules traitées sont co-incubées avec la filipine, on observe l'inhibition de la phosphorylation des protéines AKT, p38, JNK, CREB, GSK3, STAT1 et 4, e-NOS, MSK, PLC- γ , PYK-2 et paxillin ; alors que, seulement une diminution de la phosphorylation est observée pour les protéines ERK1/2, c-JUN, p53, RSK, STAT2, et p70S6k. Cela confirme que ces protéines sont des effecteurs en aval de la formation des radeaux lipidiques et qu'elles sont potentiellement impliquées dans les effets non ciblés médiés par les ¹²⁵I-AcM.

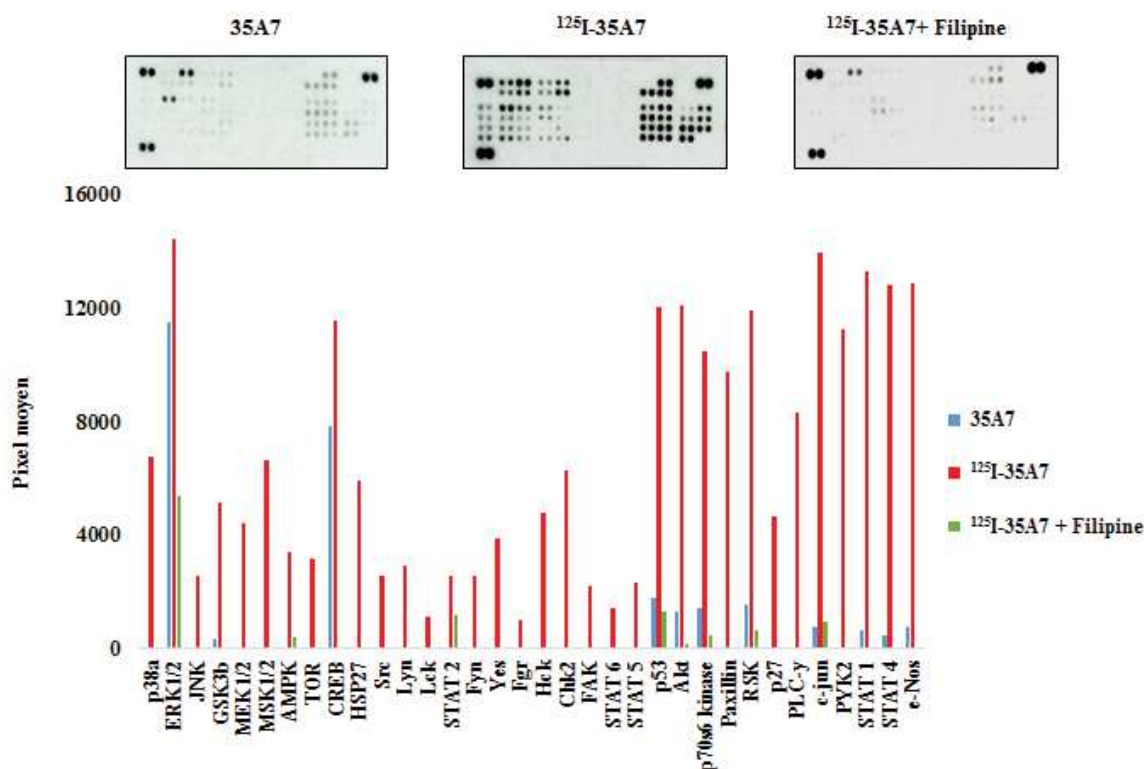


Figure 76 : voies de signalisation activées dans les cellules donneuses HCT 116 p53^{+/+} traitées en RIT ¹²⁵I [403].

Par ailleurs l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de ERK1/2 (U0126), de AKT (ZSTK474), de p38 (SB203580) et de JNK (SP600125) montre que, parmi les protéines activées, p38 et JNK sont principalement impliquées dans la réponse des cellules après expositions aux ¹²⁵I-AcM (Figure 77).

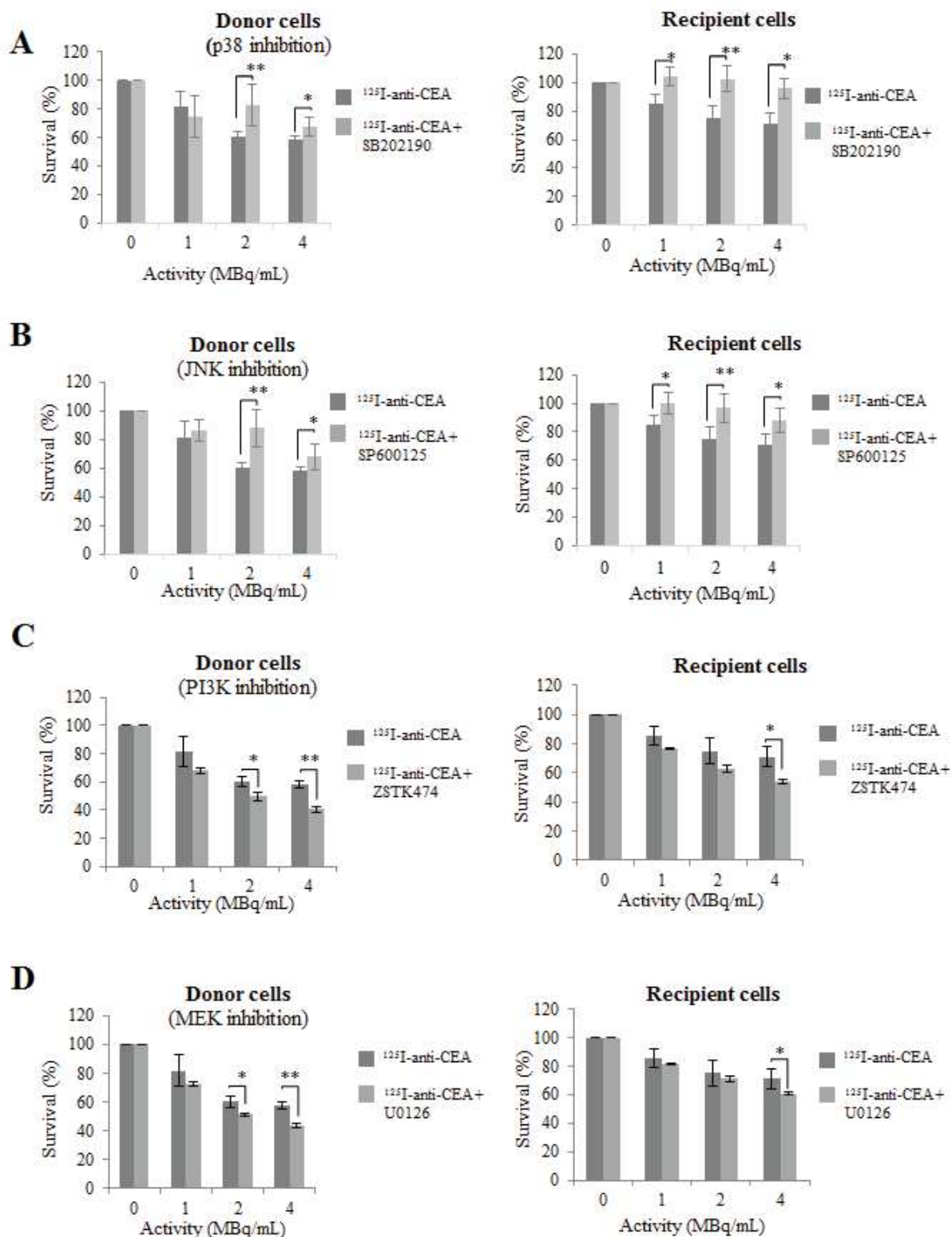


Figure 77 : inhibition des voies MAPK dans les cellules HCT 116 p53^{+/+} traitées en RIT Auger [403]. (A) SB203580 (inhibiteur de p38) ; (B) SP600125 (inhibiteur de JNK) ; (C) ZSTK474 (inhibiteur de PI3K et indirectement des voies en amont de AKT) ; (D) U0126 (inhibiteur de MEK1/2 et indirectement des voies en amont de ERK1/2).

b. Les protéines de stress

Le traitement au ^{213}Bi des cellules SK-OV-3_{AMHRII} et AN3CA a aussi révélé l'activation de la protéine NF- κ B (Figure 78). Cette protéine pro-inflammatoire est activée suite à divers stimuli. Les protéines HSP27 (*Heat shock proteins*), COX-2 (*cyclooxygénase 2*, induite par NF- κ B) qui sont également impliquée dans l'inflammation se retrouvent activées. Afin d'évaluer la nature des protéines impliquées dans le stress chez les cellules, nous avons utilisé la membrane protéomique de stress capable de détecter le niveau d'expression de 26 protéines de stress. Les résultats (Figure 79) confirment l'activation des protéines pré-citées mais également de beaucoup d'autres protéines comme celles impliquées dans l'apoptose (Cytochrome C), l'arrêt du cycle cellulaire (p21/CIP1), la protéine de prévention des dommages HSP60. Le stress hypoxique est observé par l'activation des protéines HIF-1 α (*Hypoxia-inducible factors*), HIF-2 α , et de CAIX (*carbonic anhydrase 9*) induite par l'activation de HIF-1 α . De même, on note la présence des protéines anti-oxydantes PON 2, 3 (*Paraoxonase 1 et 2*). Néanmoins, signalons que ces protéines sont davantage activées dans les cellules receveuses que dans les cellules donneuses témoignant ainsi du stress (oxydatif, hypoxique) occasionné par les facteurs solubles contenus dans le CM transféré sur les cellules receveuses.

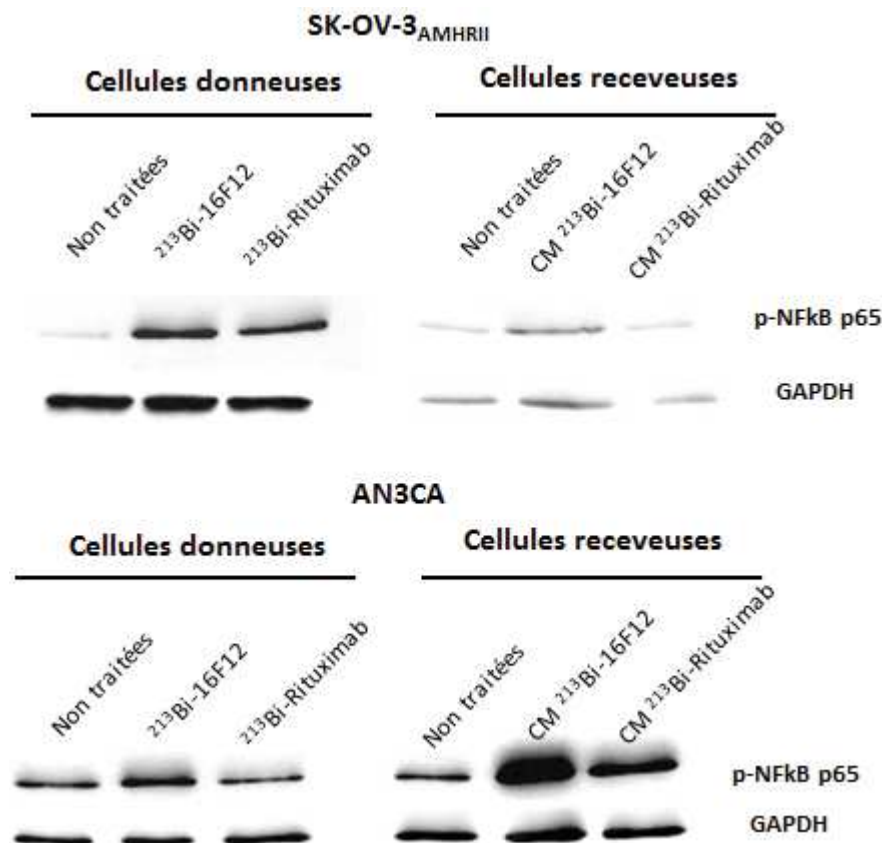


Figure 78 : activation de la protéine NF- κ B dans les cellules traitées en RIT au ^{213}Bi .

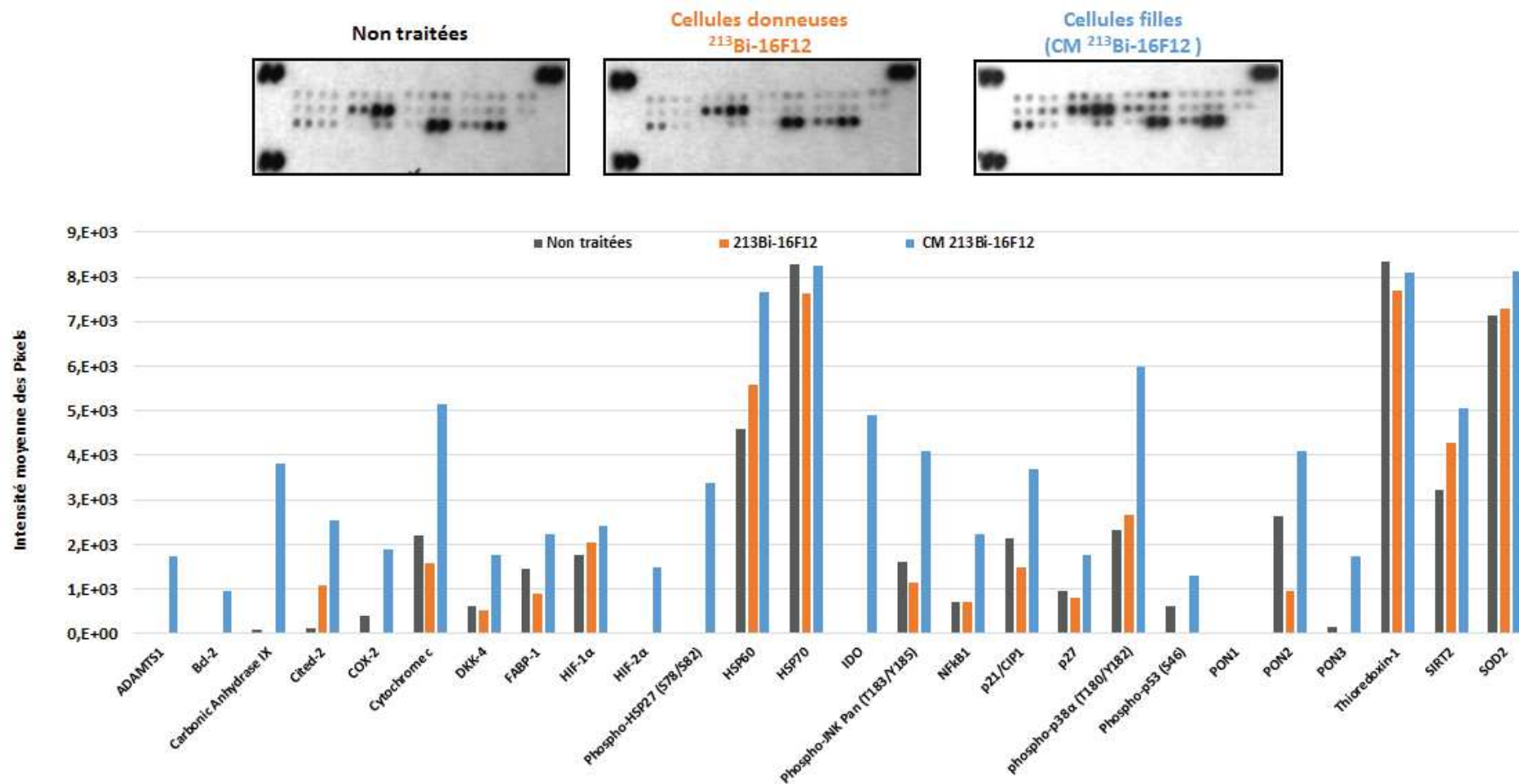


Figure 79 : mesure des protéines de stress activées dans les cellules SK-OV-3_{AMHRII} traitées en RIT du ²¹³Bi-16F12.

4. Les cytokines

L'implication des cytokines dans la médiation des effets non ciblés a également été évaluée. Pour cela le CM des cellules SK-OV-3_{AMHRII} traitées au ²¹³Bi a été testé sur la membrane Human XL Cytokine Array Kit (R&D Systems) (Figure 80). On observe une surexpression de 4 protéines à savoir ICAM-1, l'interleukine-8 dont l'implication dans les effets non ciblés a été rapportée dans de nombreuses études, la lipocalin-2 (*LCN2* ou *24p3* ou *NGAL* = *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*) qui est sécrétée par les cellules épithéliales en réponse à une inflammation ou tumorigenèse et la protéine de l'angiogenèse VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). A l'inverse, on observe une forte inhibition de l'interleukine-17A, de MIF (*Macrophage Migration Inhibitor*) une cytokine pro-inflammatoire jouant un rôle clé dans l'immunité de la cellule, et de l'OPN (*osteopontin*) considérée comme un biomarqueur du cancer de l'ovaire. L'inhibition de l'adiponectine et de la protéine CD30 est également observée. Le tableau 14 présente les valeurs des ratios : CM cellules traitées/ CM cellules non traitées ou des ratios inverses.

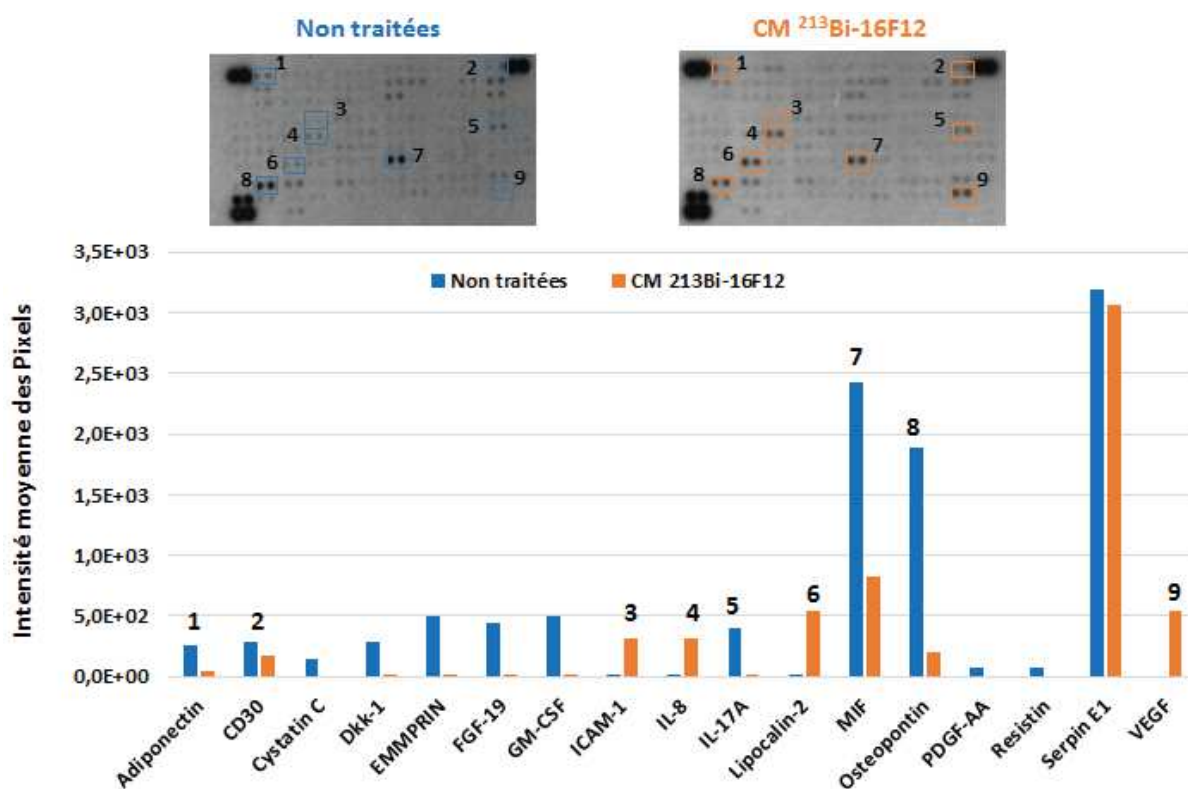


Figure 80 : analyse des cytokines contenues dans le CM des cellules SK-OV-3_{AMHRII} traitées au ²¹³Bi-16F12.

Tableau 14 : ratio des cytokines observées dans les cellules traitées et non traitées.

Cytokines	Ratio	
	CM/non traitées	Non traitées/CM
Adiponectine	-	5
CD30	-	2
ICAM	139	-
IL-8	139	-
IL-17A	-	224
Lipocaline-2 (LCN2)	10709	-
MIF	-	3
Ostéopontine (OPN)	-	10
VEGF	53585	-

On observe que la LCN2 est fortement surexprimée par les cellules donneuses après traitement par RIT au ^{213}Bi -16F12. Elle pourrait donc jouer un rôle important dans les effets non ciblés observés sur les cellules receveuses. Pour cela l'expression des récepteurs de la lipocaline (LCN2R) par nos cellules a été vérifiée. On observe une bonne expression de LCN2R dans les cellules SK-OV-3_{AMHRII}. Enfin on note que VEGF est la cytokine la plus exprimée après une RIT des cellules SK-OV-3_{AMHRII} au ^{213}Bi .

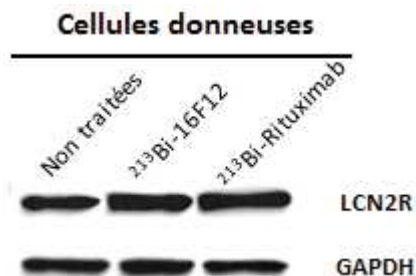


Figure 81 : mesure de l'expression du récepteur de la lipocalin 2 (LCN2R) dans les cellules SK-OV-3_{AMHRII}

II. Expérimentations *in vivo*

A. Radioimmunothérapie alpha au ^{212}Pb

Lors de premières expérimentations conduites par l'équipe [397], l'efficacité anti-tumorale de l'anticorps non internalisant (^{212}Pb -35A7) et de l'anticorps internalisant (^{212}Pb -trastuzumab) dans la RIT IP de carcinomes péritonéaux de petite taille a été étudiée. Pour cela, des souris athymiques porteuses de greffes IP (2 – 3 mm) de cellules A-431-CEA-Luc ont été traitées avec des activités croissantes (0,37 – 1,48 MBq/mg) d'anticorps spécifiques 35A7, trastuzumab et de l'anticorps non spécifique PX tous radiomarqués au ^{212}Pb . Le groupe contrôle a reçu la même quantité d'anticorps non radiomarqués ou de NaCl. La survie médiane a par la suite été tracée sur la période d'étude (130 jours) en faisant un suivi par bioluminescence. La biodistribution des deux anticorps spécifiques a également été déterminée et la dose cumulée dans les organes et la tumeur calculée.

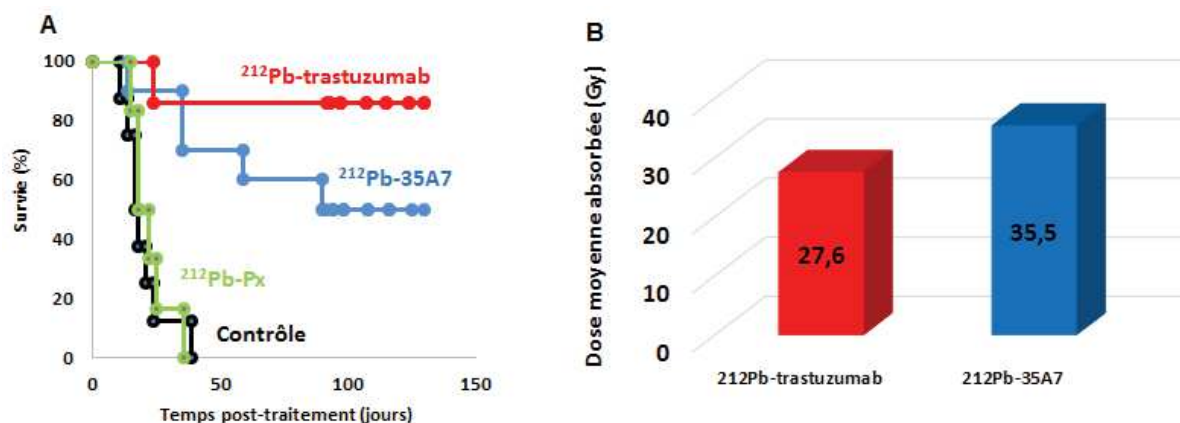


Figure 82 : mesure de la survie (A) et de la biodistribution (B) des cellules A-431_{CEA-Luc} traitées avec les ^{212}Pb -AcM [397].

La courbe de Kaplan Meyer (Figure 82A) montre que la meilleure efficacité est obtenue pour la RIT à 1,48 MBq. Une médiane de survie (MS) de 94 jours a été observée pour les souris traitées avec le ^{212}Pb -35A7, tandis que la MS n'a pas été atteinte pour les souris traitées avec le ^{212}Pb -trastuzumab, indiquant une efficacité thérapeutique supérieure de l'anticorps internalisant. Néanmoins, la dosimétrie de la tumeur, réalisée en supposant que les tumeurs étaient de forme sphérique et que la radioactivité était distribuée de manière homogène, a montré que la dose moyenne reçue par les tumeurs traitées au ^{212}Pb -35A7 (35,5 Gy) était supérieure à celle reçue par les tumeurs traitées au ^{212}Pb -trastuzumab (27,6 Gy). La biodistribution démontre donc qu'il n'y a pas de correspondance entre la dose de rayonnements absorbée par les tumeurs et la survie finale observée chez les animaux. Une telle conclusion peut s'expliquer par une distribution non homogène de la radioactivité par les différents anticorps.

Ainsi, afin de mieux comprendre le mécanisme d'absorption des trois AcM, l'évaluation des hétérogénéités de distribution de l'activité au niveau de la tumeur a été réalisée en utilisant un système d'imagerie digitale par autoradiographie (DAR). Les images DAR représentatives

des différentes tumeurs traitées avec les anticorps radiomarqués sont présentées dans la Figure 83.

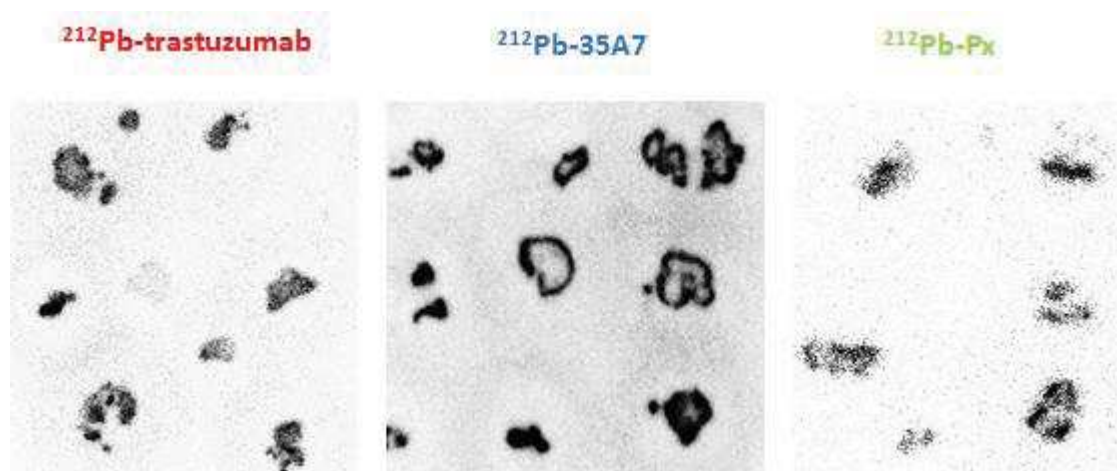


Figure 83 : images autoradiographiques des différentes tumeurs traitées avec les anticorps radiomarqués au ^{212}Pb .

On observe une distribution hétérogène des radiopharmaceutiques dans la plupart des tumeurs, en particulier pour les tumeurs traitées avec l'anticorps non internalisant ^{212}Pb -35A7. Pour ces tumeurs, la radioactivité semble visuellement localisée en périphérie de la tumeur, le centre semblant ne recevoir que très peu de dose. Le calcul de la dose absorbée par les différentes tumeurs a par la suite été réalisé en utilisant les images obtenues par autoradiographie.

1. Dosimétrie de la tumeur

Comme mentionné dans la partie Matériel et Méthodes, deux approches ont été utilisées pour déterminer la dose absorbée par la tumeur. La première approche suppose une forme sphérique et une distribution homogène du radiopharmaceutique dans la tumeur (dosimétrie standard) alors que la seconde approche prend en compte l'hétérogénéité de la radioactivité dans la tumeur pour obtenir la distribution de la dose absorbée au niveau du voxel (dosimétrie voxelisée).

a. Dosimétrie standard : dose moyenne absorbée par la tumeur

Pour déterminer la dose moyenne absorbée par la tumeur, il faut tenir compte de tous les nodules tumoraux présents sur les images du DAR. La masse des tumeurs a été calculée comme décrit (voir Matériels et Méthodes) puis l'activité cumulée (Bq.s/g) dans chaque nodule déterminée. La dose moyenne dans les tumeurs est obtenue par la formule du MIRD : $D = \tilde{A} \times S$. Les facteurs S utilisés sont ceux de la Figure 42. La dose a également été déterminée par une autre méthode qui ne fait pas intervenir la masse de chaque nodule tumoral (on suppose que l'extraction des masses à partir des images 2D du DAR peut conduire à de faux facteurs S

pour une tumeur donnée et donc à une erreur dans le calcul de la dose), mais qui suppose que toute l'énergie émise dans la tumeur ($E_{\text{dep}} = 8,7 \text{ MeV/Bq.s}$) est absorbée par la tumeur elle-même (approximation de la self-absorption). Les résultats obtenus par les deux méthodes sont présentés dans le tableau 15.

Tableau 15 : doses tumorales moyennes absorbées des trois anticorps, obtenue en utilisant des facteurs S tumoraux spécifiques (dosimétrie spécifique de la tumeur) ; et en supposant une absorption locale et complète de l'énergie.

Anticorps	Dosimétrie spécifique de la tumeur			Absorption locale et complète de l'énergie
	Masse (g)	Dose (Gy)	Ecart-type	Dose (Gy)
Tumeurs traitées ^{212}Pb -trastuzumab	$6,9 \times 10^{-4}$	28,1	2,1	34,1
Tumeurs traitées ^{212}Pb -35A7	$8,3 \times 10^{-4}$	36,1	2,6	43,4
Tumeurs traitées ^{212}Pb -PX	$6,4 \times 10^{-4}$	17,7	1,3	22,0

La distribution de la dose absorbée aux tumeurs, calculée sur la base des images du DAR est en accord avec les doses déterminées dans l'étude précédente (27,6 Gy pour les tumeurs traitées ^{212}Pb -trastuzumab et 35,5 Gy pour les tumeurs traitées ^{212}Pb -35A7). La non corrélation dose-effet est donc bien confirmée. Dans le tableau, est également rapportée la moyenne de la masse tumorale estimée à partir des images 2D du DAR. L'écart type sur la dose moyenne absorbée est calculé à partir des doses déterminées pour chacun des nodules tumoraux contenus dans les images DAR. Une dose absorbée unique et indépendante de la masse tumorale a été calculée pour l'approximation d'une absorption locale et complète de l'énergie. En tenant compte des masses tumorales obtenues dans cette étude, la dose moyenne absorbée par les tumeurs en faisant cette approximation est surestimée de 10 à 50%. Cela montre donc qu'en réalité, pour des tumeurs de masses d'environ 0,5 g, l'hypothèse d'une absorption locale et totale de l'énergie par les tumeurs traitées n'est pas vérifiée.

b. Dosimétrie voxelisée

Nous avons pu observer que la distribution de la radioactivité dans les tumeurs était hétérogène particulièrement avec les tumeurs traitées au ^{212}Pb -35A7. Le calcul de la dose absorbée au niveau du voxel est donc nécessaire, si cette hétérogénéité doit être prise en compte.

Pour déterminer la dose au niveau du voxel, une tumeur caractérisant les tumeurs de chaque groupe traité a été sélectionnée puis la dose déterminée comme décrit précédemment. La Figure 84 montre la localisation de la dose absorbée dans les différentes régions de chacune des tumeurs sélectionnées. Visuellement on peut observer l'hétérogénéité de la distribution de la dose dans les tumeurs principalement pour la tumeur traitée au ^{212}Pb -35A7. Comme prévu,

le dépôt d'énergie du ^{212}Pb est principalement localisé au niveau des voxels où l'émission (désintégration) a eu lieu.

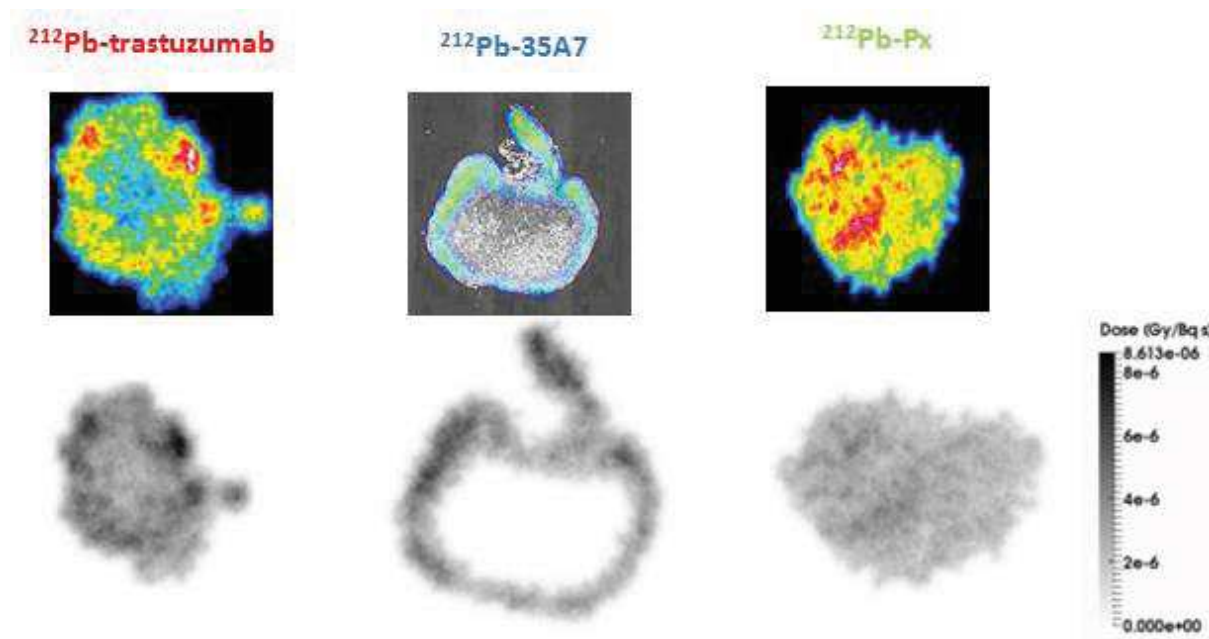


Figure 84 : distributions de dose absorbée obtenue pour chacune des tumeurs traitées au ^{212}Pb . Les images de tumeur en gris sont à la même échelle d'intensité.

Les doses moyennes absorbées des trois tumeurs considérées ont été établies en limitant le calcul à la partie centrale de la coupe pour les distributions de dose absorbée simulées. Les résultats sont présentés dans le tableau 16 avec les masses tumorales estimées et les activités cumulées pertinentes. Les facteurs S correspondants aux trois masses tumorales sont également reportés. La différence entre les doses moyennes absorbées obtenue par la dosimétrie standard et par l'approche de la dosimétrie du voxel est inférieure à 4% pour chacun des trois anticorps.

Tableau 16 : les doses moyennes absorbées (Gy/Bq.s et Gy) obtenue pour chacune des tumeurs sélectionnées pour la dosimétrie voxelisée.

Anticorps	Dose (Gy/Bq.s)	Masse (g)	Facteurs S (Gy/Bq.s)	$\tilde{A}t$ (Bq.s/g)	$\tilde{A}t$ (Bq.s)	Dose (Gy)
Tumeurs traitées ^{212}Pb -trastuzumab	$8,6 \times 10^{-7}$	$1,4 \times 10^{-3}$	$8,6 \times 10^{-7}$	$2,4 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^7$	30,5
Tumeurs traitées ^{212}Pb -35A7	$6,2 \times 10^{-7}$	$1,9 \times 10^{-3}$	$6,4 \times 10^{-7}$	$3,1 \times 10^{10}$	$6,1 \times 10^7$	38,2
Tumeurs traitées ^{212}Pb -Px	$5,1 \times 10^{-7}$	$2,3 \times 10^{-3}$	$5,3 \times 10^{-7}$	$1,5 \times 10^{10}$	$3,7 \times 10^7$	19,4

L'approche de la dosimétrie voxelisée confirme les doses obtenues en utilisant l'approche de la dosimétrie standard (28,12, 36,16 et 17,74 respectivement pour le ^{212}Pb -trastuzumab, ^{212}Pb -35A7 et ^{212}Pb -PX). En radiothérapie, il est courant après planification de la

dosimétrie de tracer l’histogramme dose-volume (HDV) qui est une représentation graphique de la distribution de la dose dans le volume de l’organe avec en abscisse la dose et en ordonnée le pourcentage de volume de l’organe. C’est actuellement la façon la plus complète de décrire la dose reçue par un organe à risque.

Le but d'un HDV est donc de résumer des distributions de dose en 3D dans un format graphique 2D. Le HDV de chacune des tumeurs a été tracé (Figure 85) et nous montre que la tumeur traitée au ^{212}Pb -35A7 reçoit des doses plus fortes que les autres anticorps. Par exemple 50% de la tumeur reçoit au moins 40 Gy contre 35 Gy et 25 Gy respectivement pour le ^{212}Pb -trastuzumab et le ^{212}Pb -PX. On observe également que 1 – 2% de la tumeur traitée au ^{212}Pb -35A7 reçoit jusqu'à 140 Gy alors que la dose maximale reçue pour la tumeur traitée au ^{212}Pb -trastuzumab est de 60 Gy et 40 Gy pour la tumeur traitée avec l’anticorps non spécifique ^{212}Pb -PX. Il est important de noter que l’on observe que 30% de la tumeur traitée au ^{212}Pb -35A7 reçoit une dose égale à 0 Gy qui pourrait alors expliquer la faible efficacité thérapeutique obtenue avec cet anticorps.

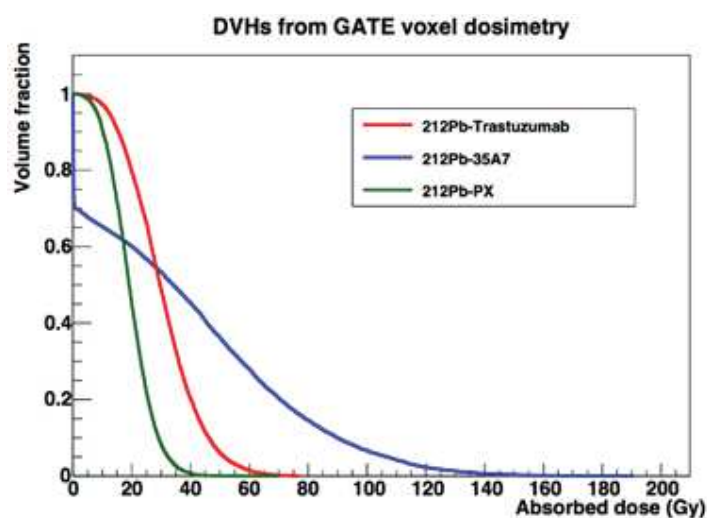


Figure 85 : histogrammes dose volume des tumeurs traitées avec le ^{212}Pb -trastuzumab (rouge), ^{212}Pb -35A7 (bleu) et ^{212}Pb -PX (vert). Environ 30% des tumeurs avec le ^{212}Pb -35A7 reçoivent une dose absorbée nulle.

Si 30% de la tumeur traitée au ^{212}Pb -35A7 ne reçoit aucune dose, cela devrait s’accompagner de la reprise rapide de la croissance tumorale. Pour vérifier cela, nous avons alors tracé la courbe de croissance tumorale en se basant sur les valeurs des masses tumorales des souris traitées mesurées par bioluminescence. Sur la Figure 86, est représentée la croissance des tumeurs dont la masse correspond à 30% de la masse initiale des tumeurs traitées ceci afin de simuler la pousse des 30% du volume tumoral ayant reçu 0 Gy. On observe un fort retard de croissance de la tumeur traitée avec le ^{212}Pb -35A7 (courbe bleu) comparée à la courbe théorique (courbe jaune). Cela suppose alors que la portion tumorale de 30% ne recevant aucune dose ne se comporte pas comme une tumeur contrôle mais subit quand même une altération de sa croissance probablement par des médiateurs cytotoxiques provenant des zones irradiées qui l’entourent suggérant la présence des effets bystander *in vivo* dans notre modèle.

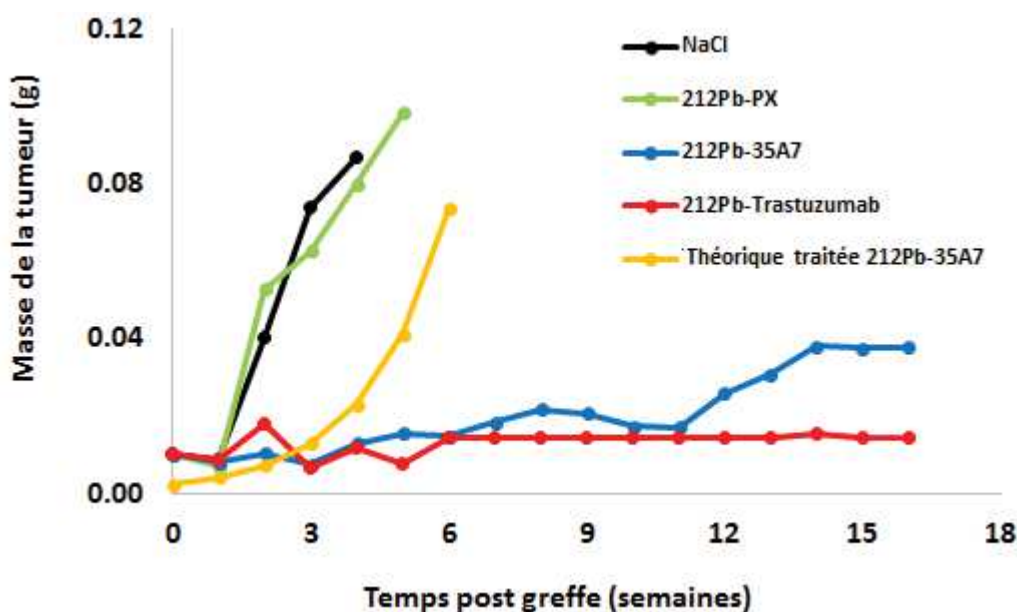


Figure 86 : courbe de croissance tumorale des tumeurs traitées avec les ^{212}Pb -AcM. (Noir) tumeurs contrôles ; (Vert) tumeurs traitées avec l'anticorps non spécifique ^{212}Pb -PX ; (Bleu) tumeurs traitées avec le ^{212}Pb -35A7 ; (Rouge) tumeurs traitées avec le ^{212}Pb -trastuzumab ; (Jaune) représentation des 30% de volume tumorale du ^{212}Pb -35A7.

2. Corrélation des dommages de l'ADN et de l'énergie déposée dans les tumeurs

a. Mesure des foci 53BP1 *in vivo*

Pour évaluer les dommages de l'ADN induits par le traitement de RIT au ^{212}Pb , nous avons procédé au marquage immunohistochimique sur coupes des foci 53BP1 induits dans les tumeurs traitées par les différents anticorps utilisés (Figure 87). Nous avons ainsi pu observer dans la tumeur traitée par le ^{212}Pb -35A7 que le nombre moyen de foci induits dans les régions irradiées (périphérie de la tumeur) et les régions non irradiées ou ayant reçu très peu de dose (centre de la tumeur) étaient identiques (7 foci/cellule). Les activités mesurées correspondantes à ces régions sont respectivement de 200 cpm/mm² et 86 cpm/mm². Cela laisse supposer que les foci 53BP1 observés ne sont pas proportionnels à la dose absorbée dans la tumeur car, les régions non irradiées présentent un fort niveau de foci 53BP1 radio-induits (Figure 87 et 88). Cette observation indique l'existence d'effets génotoxiques dans les zones non irradiées se trouvant au voisinage immédiat des zones irradiées. Pour la tumeur traitée par le ^{212}Pb -trastuzumab dans laquelle la distribution de la radioactivité est plutôt homogène, le nombre moyen de foci mesuré est identique quel que soit la région considérée. En fonction des tumeurs considérées (plus ou moins homogène), ce nombre varie entre 4 et 7 foci/cellule. Pour le ^{212}Pb -trastuzumab, une relation dose effet semble se dessiner (Figure 88). Cela peut s'expliquer par une distribution plus homogène de l'activité avec cet anticorps dans la tumeur, et donc à une plus forte contribution des effets ciblés qui prennent le dessus sur les effets non ciblés.

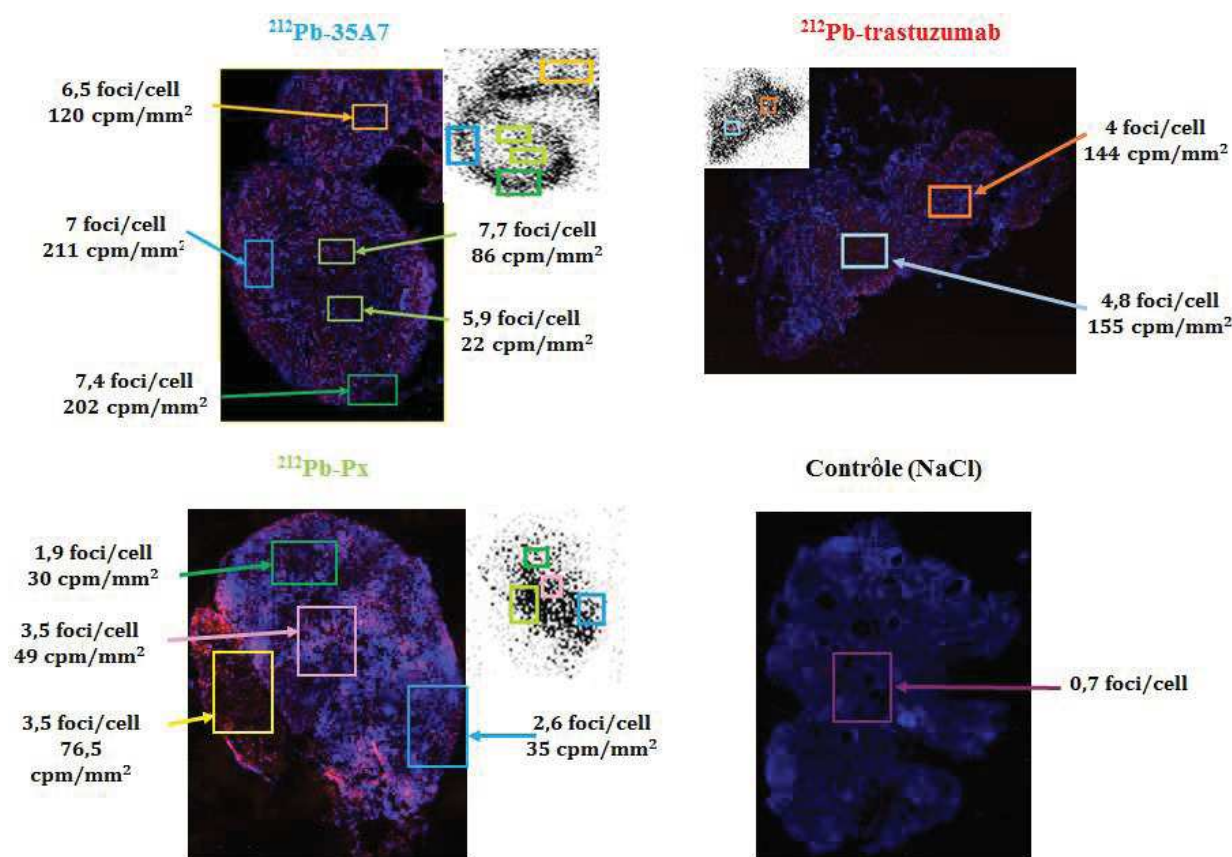


Figure 87 : corrélation du dépôt de dose avec la formation des foci 53BP1 dans les tumeurs traitées au ^{212}Pb .

Enfin le nombre de foci mesuré avec l'anticorps non spécifique dans chacune des régions de la tumeur traitée est systématiquement inférieur à celui obtenu avec les anticorps spécifiques. Il varie entre 2 et 3,5 foci/cellule pour un dépôt d'activité inférieur à 80 cpm/mm². Pour l'anticorps non spécifique, la courbe du dépôt d'activité en fonction de niveau de foci 53BP1 radio-induits montre l'existence d'une relation dose-effet. Un nombre de 0,7 foci/cellule est obtenu pour les tumeurs contrôles.

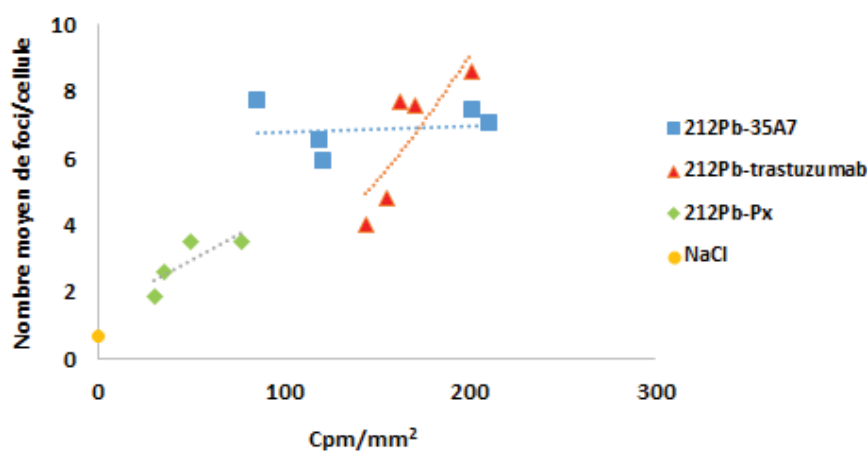


Figure 88 : nombre moyen de foci 53BP1 en fonction de la distribution de la radioactivité dans les tumeurs traitées avec les ^{212}Pb -AcM.

En RIT Auger nous avons aussi pu observer l'existence d'effets non ciblés *in vivo*. Comme dans le cas du ^{212}Pb , les souris ont été traitées avec l'anticorps 35A7 couplé à l'iode 125. La lignée HCT 116 n'a pas été utilisée comme lors des expérimentations avec l' ^{125}I car le nombre de récepteurs CEA qu'elle exprime est très faible comparé à celui de la lignée A-431_{CEA-Luc} et ne permet pas d'obtenir des doses absorbées suffisantes pour participer à l'efficacité thérapeutique. Après traitement et récupération des tumeurs irradiées, on observe qu'avec le ^{125}I -35A7, la radioactivité est comme précédemment principalement localisée en périphérie des tumeurs. Par contre, on observe que les foci 53BP1 formés se répartissent de façon homogène dans la tumeur : le nombre moyen de foci/cellule était de 4,4 au centre de la tumeur et de 4,3 en périphérie. Les activités mesurées correspondantes à ces régions sont respectivement de 2,3 et 34,7 cpm/mm² (Figure 89). L'observation d'un nombre équivalent de lésions ADN au centre et à la périphérie de la tumeur indépendamment de la dose absorbée et au-delà du parcours des électrons Auger suggère l'implication *in vivo* des effets non ciblés. Pour les tumeurs traitées avec l'anticorps non spécifique ^{125}I -PX, le nombre moyen de foci/cellule obtenu est de 0,8 au centre et de 1 à sa périphérie. Ces valeurs sont plus faibles que celles obtenues avec l'anticorps spécifique ^{125}I -35A7, en dépit d'une absorption d'activité plus grande avec le ^{125}I -PX illustrée par des valeurs d'activité de 28 et 18,2 cpm/mm² respectivement au centre et en périphérie de la tumeur.

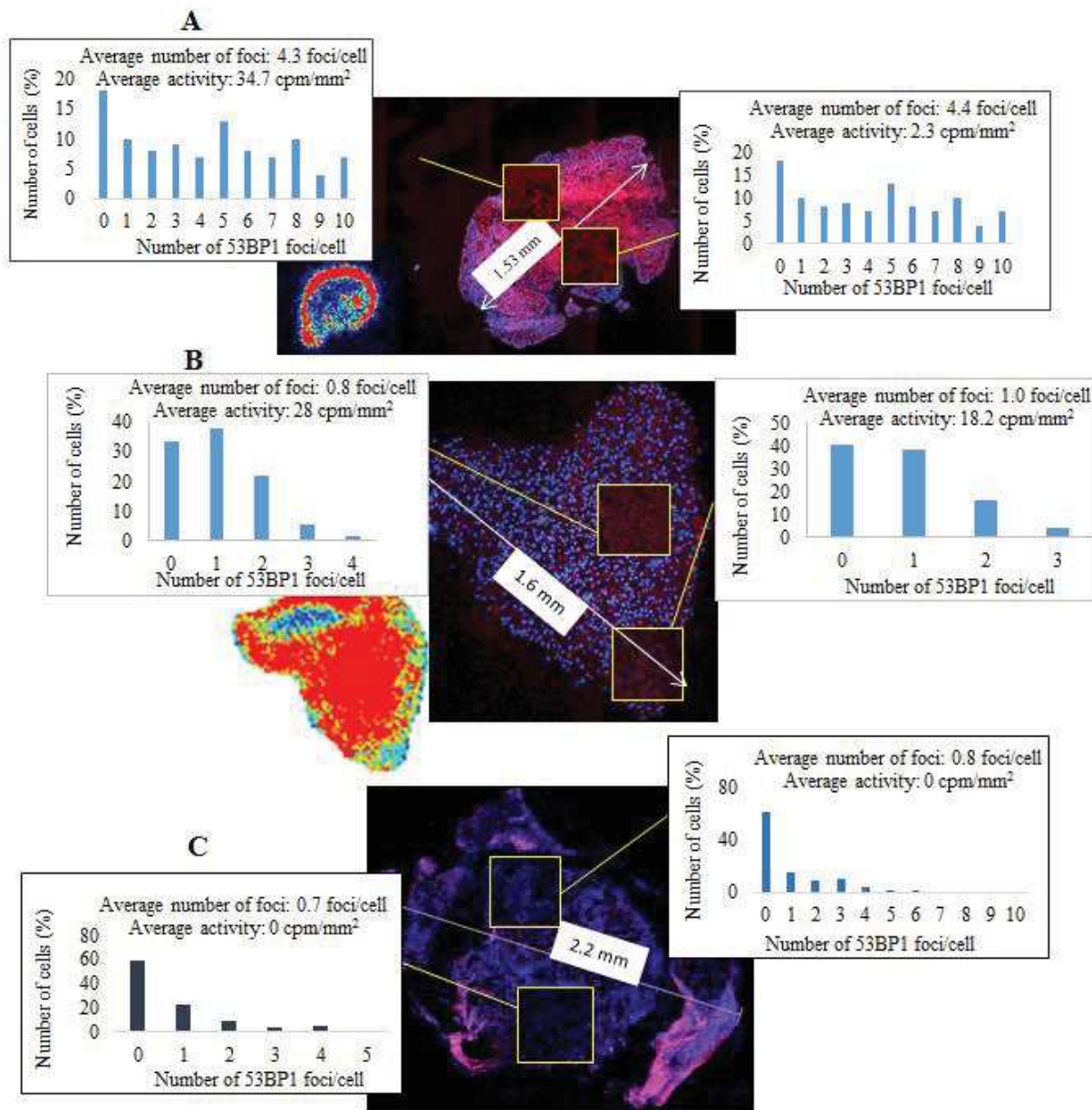


Figure 89 : mesure de la distribution de la radioactivité et de l'induction des foci 53BP1 dans les tumeurs traitées avec les ¹²⁵I-AcM [403]. (A) tumeur traitée avec le ¹²⁵I-35A7 ; (B) avec le ¹²⁵I-PX ; (C) Tumeur contrôle (injecté avec du NaCl)

b. Etude des autres lésions biologiques radio-induites

D'autres paramètres d'atteintes biologiques ont été mesurés par coloration HES en utilisant les coupes tissulaires ayant les mêmes correspondances que celles utilisées pour l'imagerie autoradiographique. Dans la tumeur traitée par le ^{212}Pb -35A7, on observe que les régions irradiées ne présentent aucune activité mitotique (mort des cellules) alors que les régions non irradiées sont marquées par des cellules en division mais celle-ci est anormale (mitoses anormales). Les mitoses anormales indiquent une instabilité génomique des cellules se trouvant à proximité de celles irradiées. Cette mitose anormale est aussi observée dans les régions non irradiées ou ayant reçu de très faibles doses délivrées par les anticorps ^{212}Pb -trastuzumab et ^{212}Pb -PX (Figure 90).

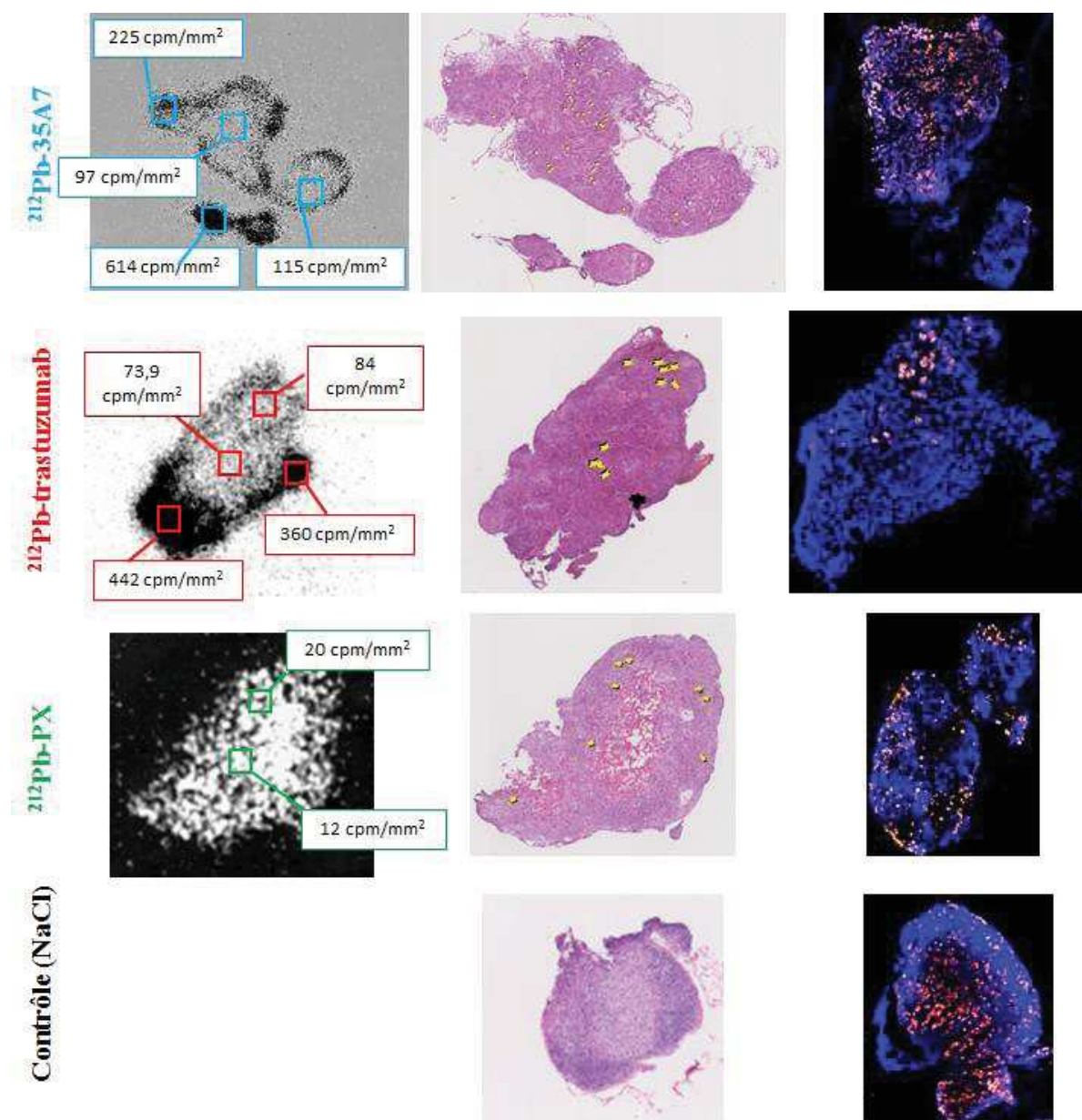


Figure 90 : corrélation des effets biologiques observés avec la distribution de la radioactivité dans les tumeurs traitées au ^{212}Pb . Les flèches jaunes sur les images HES indiquent la présence de mitoses anormales.

Cette observation a été confirmée par IHC (marqueur Ki 67). Une forte prolifération est ainsi observée avec la tumeur traitée au ^{212}Pb -35A7 où l'hétérogénéité du dépôt de la radioactivité est observée. Pour la tumeur traitée au ^{212}Pb -trastuzumab, seules les régions ayant reçu de faibles doses présentent quelques signes de prolifération. Comme attendu, la tumeur traitée par l'anticorps non spécifique présente également un grand nombre de cellules en prolifération mais un peu moins que dans la tumeur non traitée (contrôle).

En dehors des mitoses anormales relevées lors de la coloration HES, nous avons aussi pu observer dans les tumeurs traitées au ^{212}Pb , l'induction d'apoptose notamment dans les régions irradiées et d'autres types de dommages caractérisés par l'observation de cellules multinucléées ou à noyaux multilobés comme illustré Figure 91.

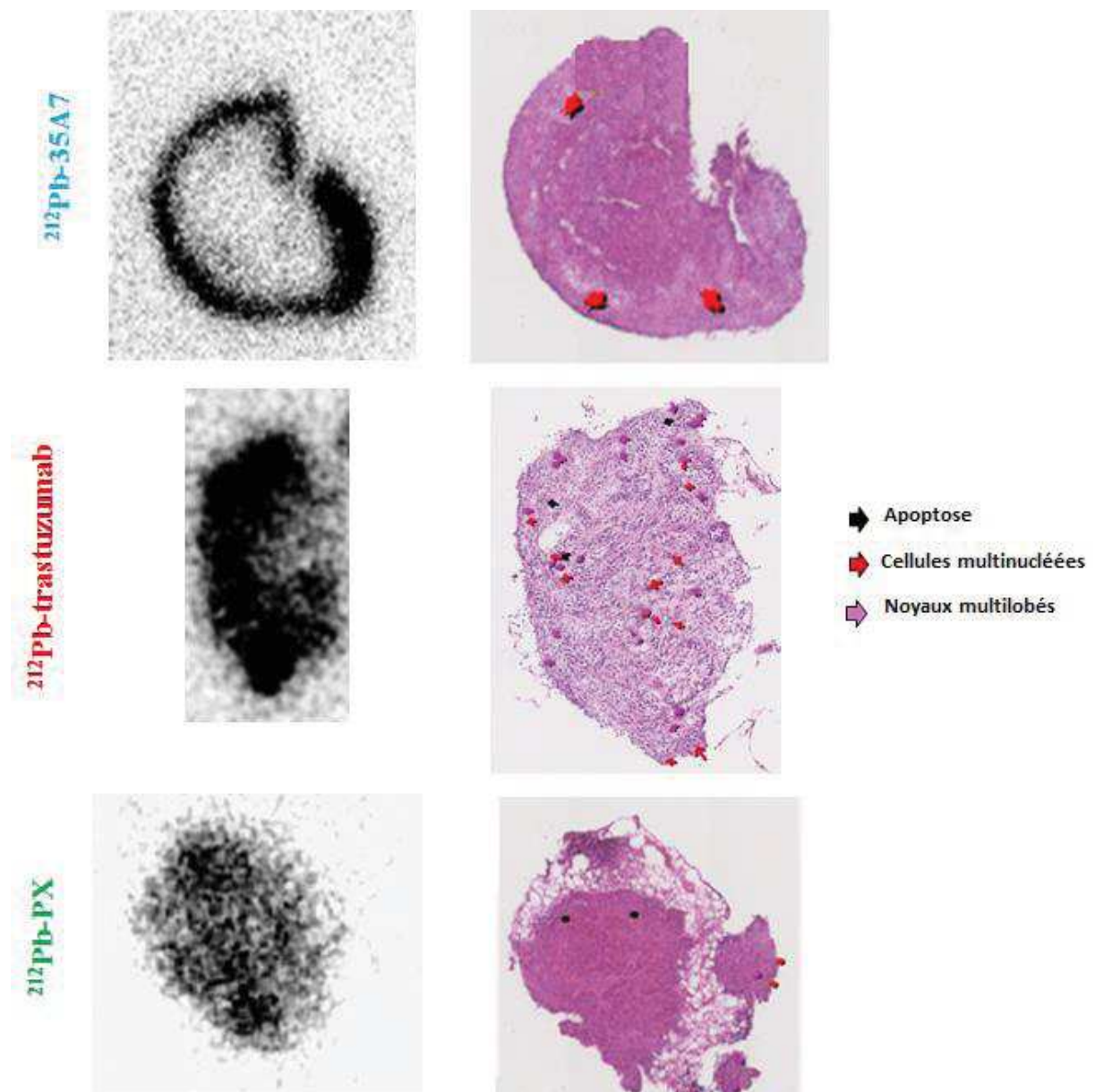


Figure 91 : lésions biologiques observées dans les tumeurs traitées avec les anticorps couplés au ^{212}Pb .

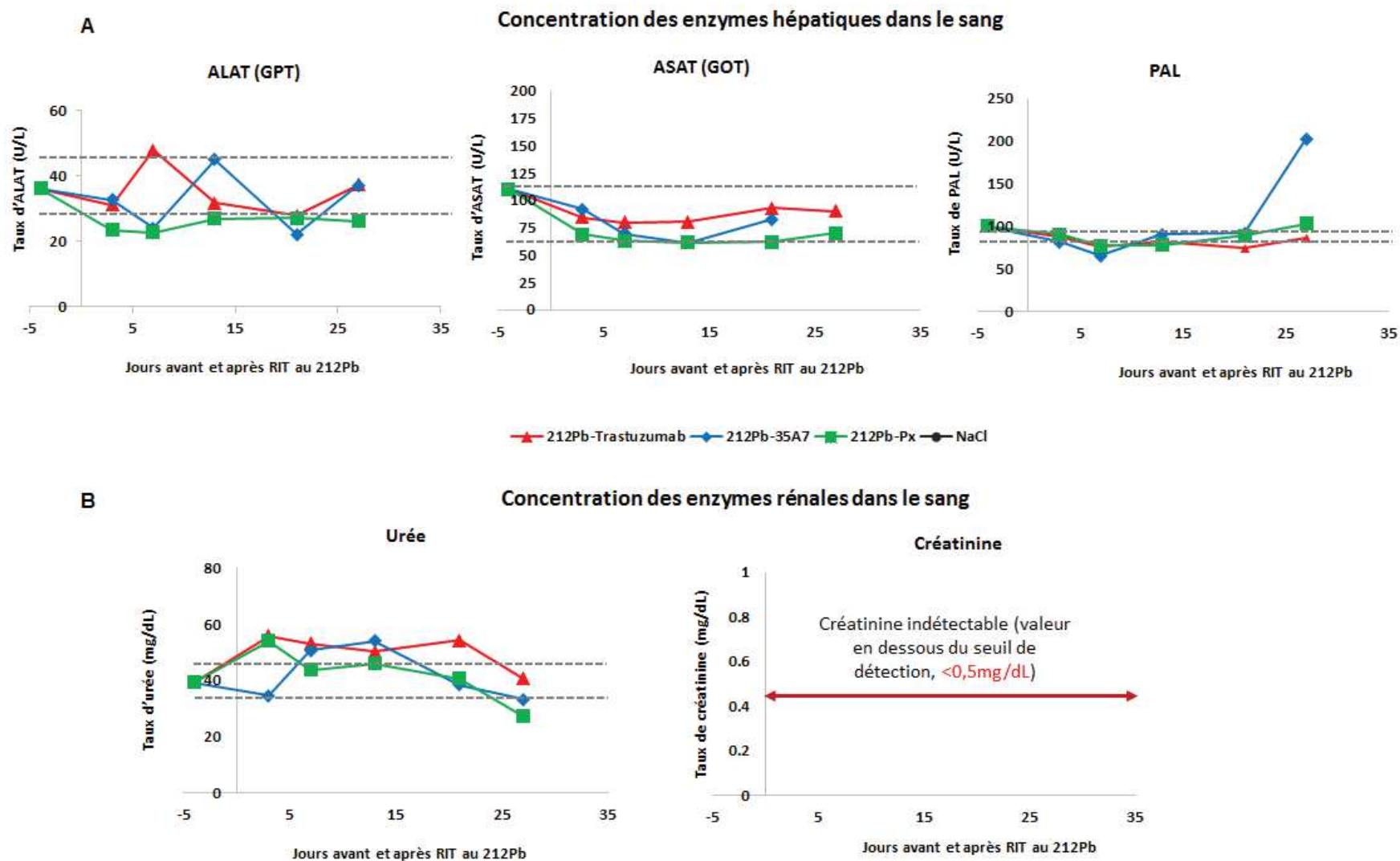
3. Toxicité observée dans le cadre de la RIT alpha au ^{212}Pb

La toxicité de la RIT au ^{212}Pb a été évaluée par la mesure de paramètres biochimiques (rénaux et hépatiques), la toxicité hématologique ayant été réalisée dans le cadre d'une précédente étude [397]. Le suivi des souris traitées avec les 3 anticorps couplés au ^{212}Pb s'est déroulé sur une période de 1 mois (toxicité précoce). Néanmoins une toxicité tardive (suivi sur 8 mois) a été réalisée sur des souris saines (sans tumeur) injectées avec l'anticorps non spécifique PX couplé au ^{212}Pb . Pour la fonction rénale, le niveau sanguin d'urée et de créatinine a été mesuré et pour la fonction hépatique ce sont les niveaux sanguins des enzymes ALAT (GPT), ASAT (GOT) et PAL qui ont été mesurés.

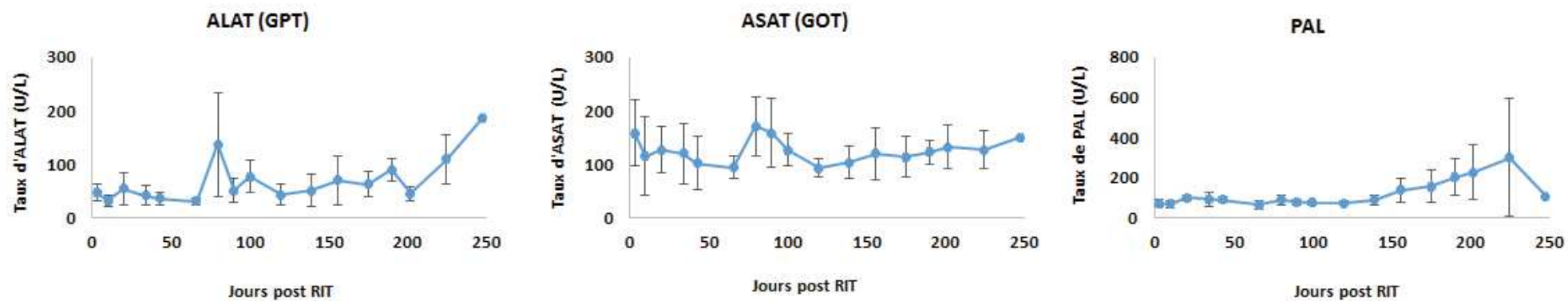
Les valeurs de référence (moyenne \pm écart-type), mesurées chez les souris non traitées sont respectivement pour ALAT, ASAT et PAL de $36,3 \pm 7,1$ (U/L), $94 \pm 23,8$ (U/L) et $89,2 \pm 7,9$ (U/L) (Figure 92). Chez les souris traitées, aucune augmentation du taux sanguin d'ALAT, d'ASAT et de PAL n'est observée au cours du premier mois de suivi. Pour la toxicité rénale, la valeur du taux d'urée mesuré chez les souris contrôles est de $40,2 \pm 5,9$ (mg/dL). A J3 après traitement on observe une baisse significative du taux d'urée avec le ^{212}Pb -35A7 ce qui n'est pas le cas du ^{212}Pb -trastuzumab ou du ^{212}Pb -PX. A J7 et J13 par contre une toxicité rénale est observée sur les souris traitées avec les anticorps spécifiques. Cette augmentation de l'urée persiste avec l'anticorps ^{212}Pb -trastuzumab jusqu'à J21 alors qu'à cette date pour l'anticorps ^{212}Pb -35A7, le taux d'urée est revenu à la normale. Aucune toxicité n'est observée pour la créatinine dont les valeurs sont en dessous du seuil de détection ($<0,5$ mg/dL).

Des analyses IHC et HES sont également en cours sur des organes sains (reins, foie) afin de confirmer/infirmier ces données biochimiques.

En ce qui concerne l'évaluation de la toxicité tardive, l'étude des paramètres hépatiques sur 8 mois devrait permettre le suivi du flux biliaire (ralentissement ou blocage). Une augmentation du taux de PAL est observée au bout de 5 mois (J156). Aux vu des écarts-types, il nous est difficile de conclure pour les autres paramètres de l'évaluation de la fonction hépatique (ALAT et ASAT). Seules les analyses IHC/HES des foies prélevés chez ces souris nous permettrons de conclure ou non à un effet tardif du traitement de RIT au ^{212}Pb .



Concentration des enzymes hépatiques dans le sang



Concentration des enzymes rénales dans le sang

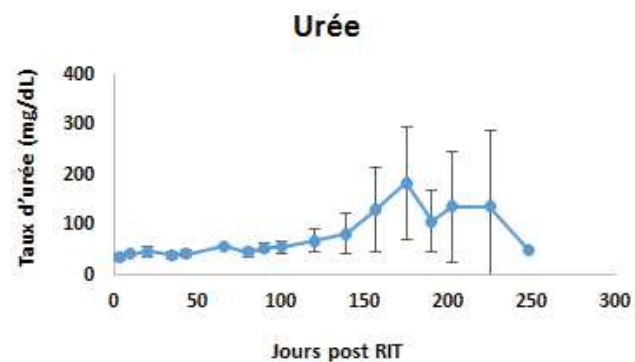


Figure 93 : toxicité tardive (sur 8 mois) des souris traitées en RIT au ^{212}Pb .

B. Radioimmunothérapie flash versus RIT IP au ^{213}Bi

Dans la deuxième partie de cette étude *in vivo*, nous avons comparé l'efficacité thérapeutique d'une RIT flash par rapport à une RIT IP classique. Pour cela après traitement des souris en RIT flash et en RIT IP classique, nous avons évalué la biodistribution de l'anticorps ^{213}Bi -16F12 aux temps 1h et 3h puis mesuré son efficacité thérapeutique.

La biodistribution (Figure 94) montre que l'activité incorporée par les organes sains en RIT IP classique est plus grande que celle mesurée dans les organes sains des souris traitées en RIT flash. Par contre, l'activité incorporée dans la tumeur après RIT flash est plus grande que celle mesurée dans la tumeur des souris traitées en RIT IP classique. En effet, en RIT flash, le pourcentage de l'activité mesurée par gramme de tissus (% AM/g tissu) pour la tumeur est de $85,4 \pm 31\%$ à 1h et de $29 \pm 11\%$ à 3h alors qu'en RIT IP classique, les valeurs notées sont de $44 \pm 4\%$ à 1h et $27,9 \pm 1,3\%$ à 3h. De même, on observe après RIT flash, qu'il y a moins d'activité dans le sang ($9,5 \pm 3,3\%$ et $13,4 \pm 4,4$ respectivement à 1h et 3h) comparé à la RIT IP classique ($14,4 \pm 2,7\%$ à 1h et $20,9 \pm 5\%$ à 3h).

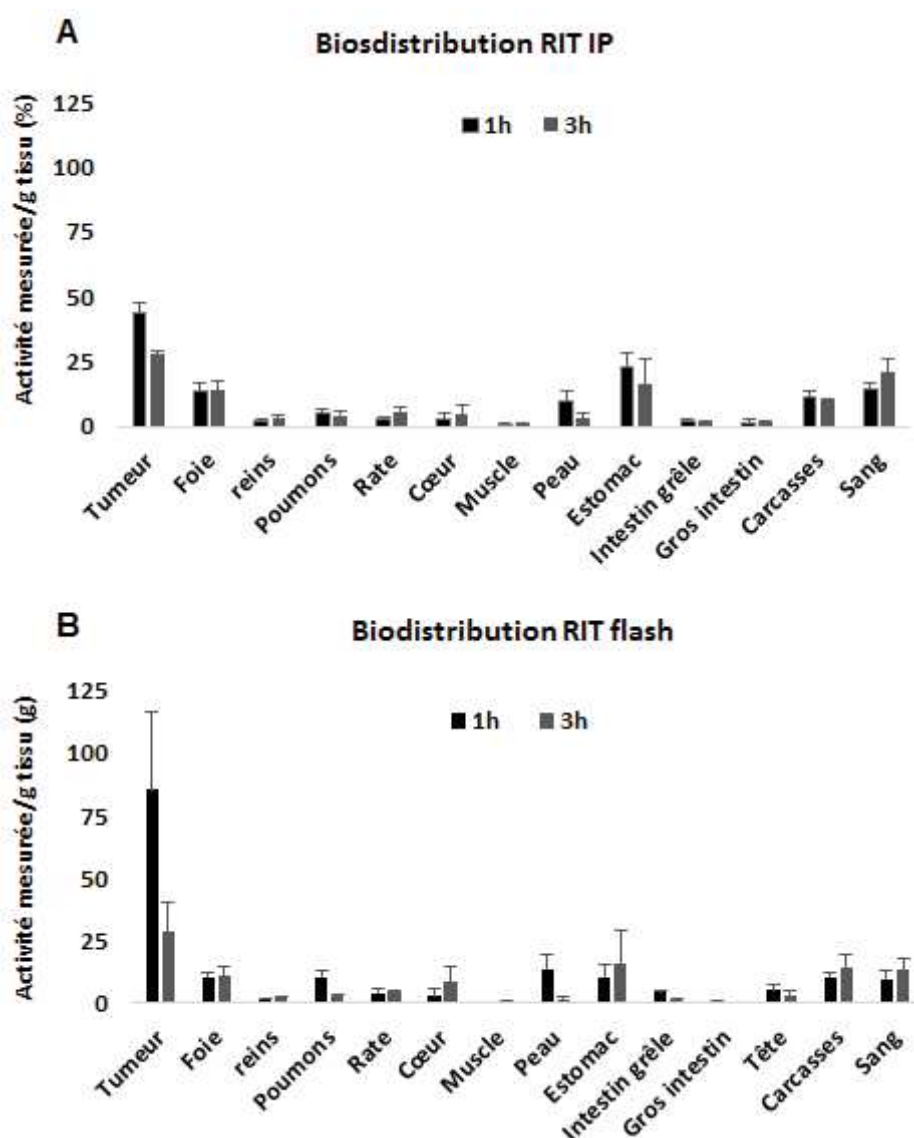


Figure 94 : biodistribution du ^{213}Bi -16F12 après RIT flash ou RIT IP classique.

Nous avons ensuite calculé le ratio tumeur/sang d'activité incorporée (tableau 17) qui fournit une indication sur la distribution de l'anticorps radiomarqué par rapport aux organes sains. On observe ainsi que 1h après traitement, ce ratio est de 9 pour la RIT flash et de 3 seulement pour la RIT IP classique. Ces résultats suggèrent que la RIT flash améliore l'incorporation de la radioactivité dans la tumeur (meilleur ciblage) et protège les organes sains d'une irradiation non spécifique.

Tableau 17 : ratio tumeur sur sang d'incorporation de l'activité mesurée dans les souris traitées en RIT flash et en RIT IP classique.

	Temps d'étude	RIT flash	RIT IP classique
Ratio tumeur / sang	1 h	9	3
	3 h	2	1

Activité incorporée dans les organes et la tumeur et dosimétrie

Comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes, les activités incorporées par les tissus dans les conditions réelles de RIT (\tilde{A}_{RIT}) ont été extrapolées à partir des activités incorporées par les tissus, mesurées lors des expériences de la biodistribution (\tilde{A}_{Biod}).

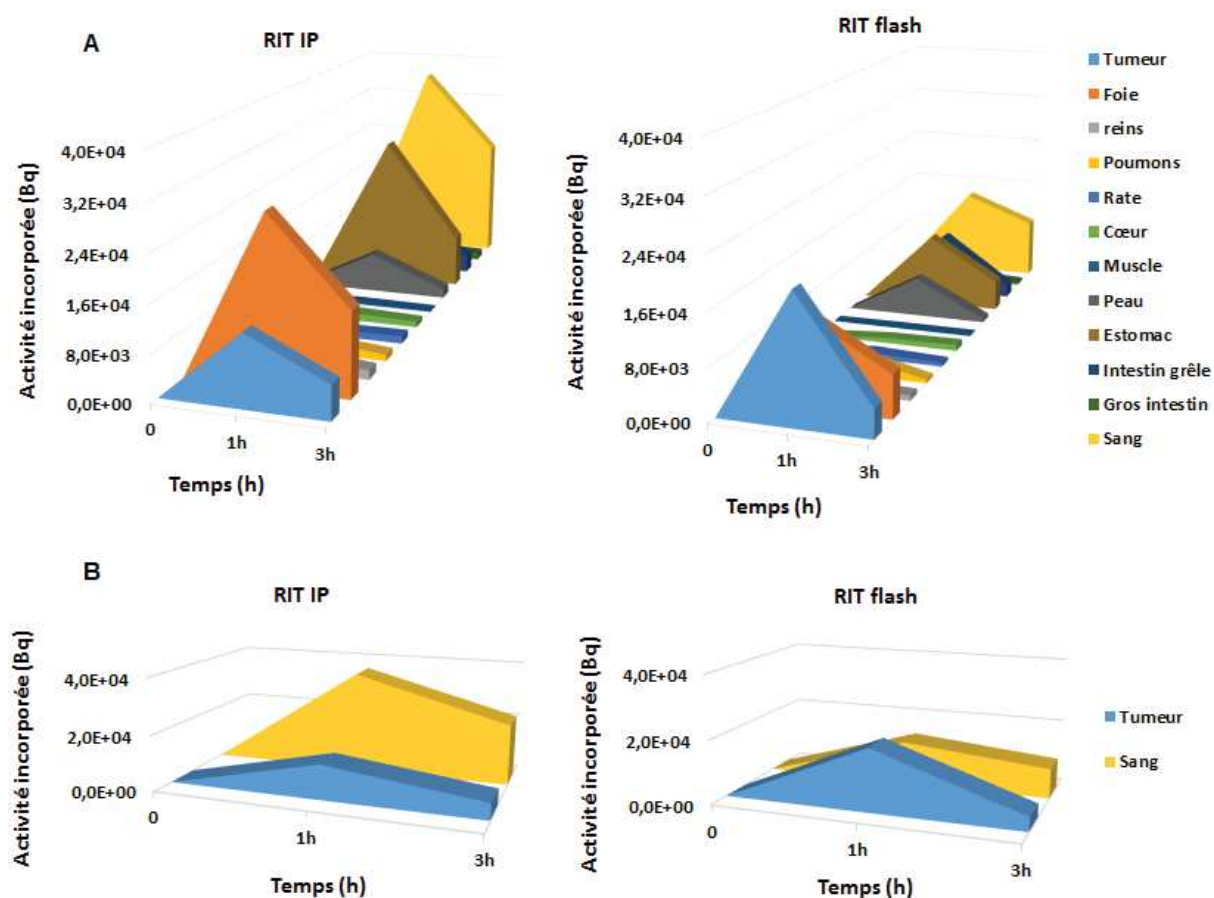


Figure 95 : activité incorporée par la tumeur et les organes en lors la RIT au ^{213}Bi en fonction du temps.

Les courbes des activités incorporées (Figure 95) démontre bien que les organes sains reçoivent plus d'activité lors de la RIT IP classique que lors d'une RIT flash et que la quantité de radioactivité dans le sang est bien supérieure dans le cas de la RIT IP classique. A partir de ces courbes, l'activité cumulée dans les organes pourra être déterminée sur le temps d'étude puis la dose absorbée par les organes et la tumeur déterminée en utilisant le formalisme du MIRD. Cette analyse dosimétrique est en cours.

c. Evaluation de l'efficacité thérapeutique du ^{213}Bi -16F12 en RIT flash et en RIT IP classique

L'efficacité thérapeutique du 16F12 couplé au ^{213}Bi a été évaluée sur des xéno greffes IP de cellules AN3CA AMHR2 positives. Le traitement a été administré aux souris à J11 après la greffe. Comme l'illustre la Figure 96, à J11 on peut observer dans le péritoine des souris, des nodules de carcinose de 1 – 2 mm correspondant à une masse moyenne de $5,87 \times 10^{-3}$ g.

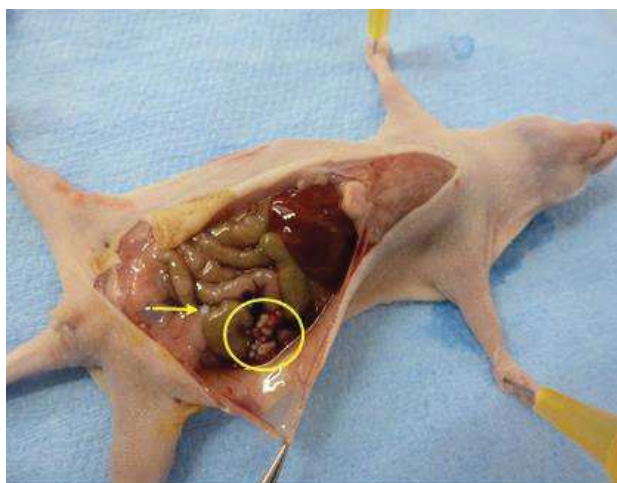


Figure 96 : nodules tumoraux observés dans le péritoine des souris avant le début du traitement au ^{213}Bi -16F12 (J11).

Pour le traitement, deux groupes de souris ont été traités en RIT flash avec des activités respectives de 12,95 MBq (qsp 0,35 mg) et 37 MBq (qsp 1mg). Un groupe de souris a été traité par l'anticorps non spécifique le ^{213}Bi -PX à 12,95 MBq. En RIT IP classique les souris ont été traitées avec une activité de 12,95 MBq. Les souris contrôles ont également été traitées en RIT flash ou RIT IP classique avec du sérum physiologique (NaCl). Aux temps d'étude définis, les souris ont été sacrifiées puis les tumeurs récupérées et mesurées.

A J11 après traitement (J22 post greffe), on observe une augmentation de la croissance tumorale dans les souris contrôles traitées en RIT flash ($8,35 \times 10^{-2} \pm 0,02$ g) et en RIT IP classique ($8,04 \times 10^{-2} \pm 0,05$ g). A l'inverse, un fort retard de la croissance tumorale est observé dans les souris traitées avec l'anticorps ^{213}Bi -16F12 ($p < 0,01$). La masse tumorale moyenne des souris traitées en RIT flash à 37 MBq est de $2,6 \times 10^{-2} \pm 0,006$ g et de $1,57 \times 10^{-2} \pm 0,01$ pour celles traitées en RIT flash à 12,95 MBq. Chez les souris traitées en RIT IP classique à 12,95 MBq, un retard de croissance est également observé avec une masse tumorale évaluée à

$3,09 \times 10^{-2} \pm 0,02$ g. A J30 post traitement, ce retard de croissance est toujours observé chez les souris traitées comparativement aux souris contrôles traitées avec du NaCl ou traitées avec l'anticorps non spécifique où on note un échappement de la croissance tumorale. La RIT flash à 37 MBq et la RIT IP classique à 12,95 MBq se révèlent plus efficace que la RIT flash à 12,95 MBq.

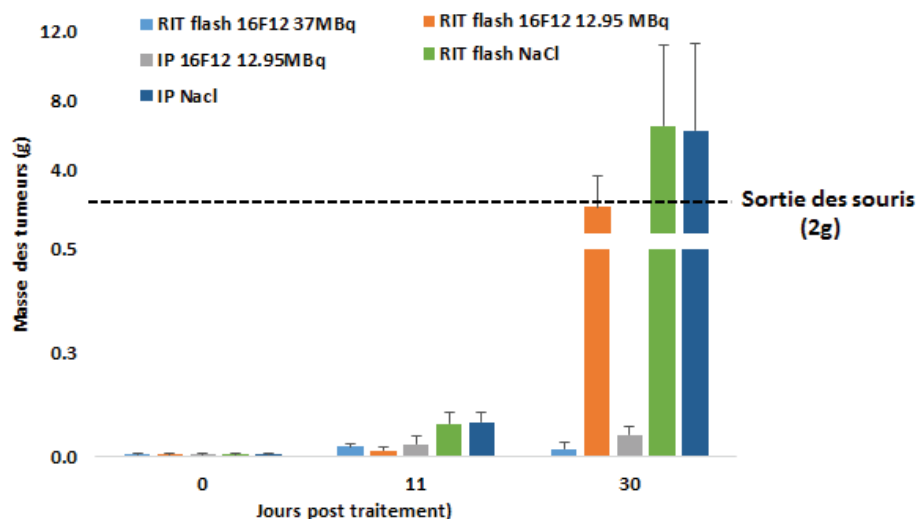


Figure 97 : courbe de croissance des souris traitées en RIT flash ou RIT IP classique du ^{213}Bi .

La courbe de tendance de la croissance tumorale a été tracée en faisant le ratio de masse des tumeurs de souris traitées par rapport à celle des souris non traitées (Figure 98). De cette courbe nous observons que la RIT IP classique se révèle plus efficace que la RIT flash même si l'évolution de la tumeur montre une même tendance. Le ^{213}Bi -16F2 présente donc une forte efficacité thérapeutique dans le traitement des carcinomes péritonéales ciblées dans notre étude.

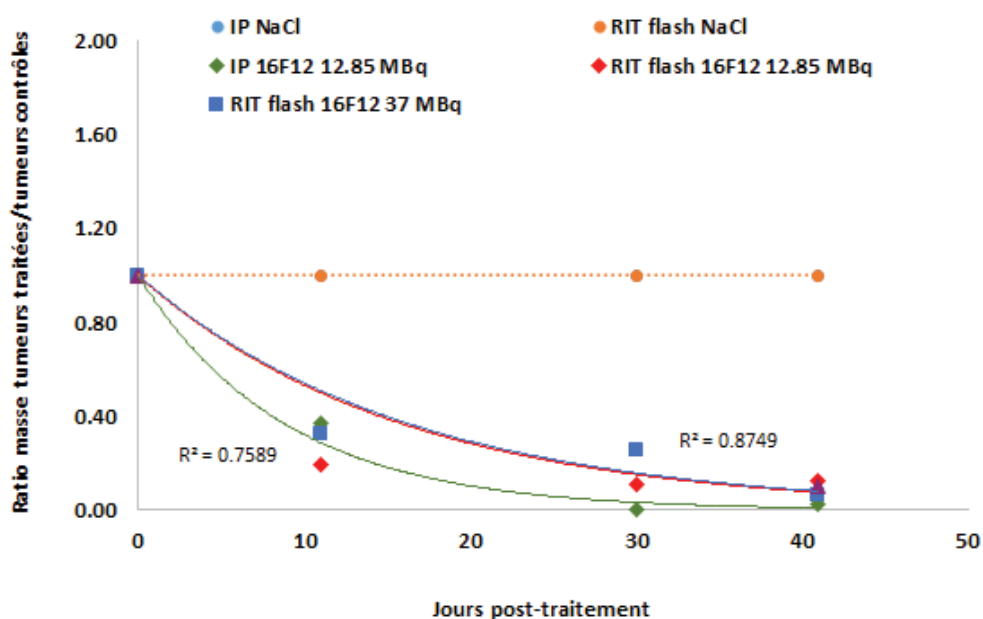


Figure 98 : courbe de tendance de la croissance des souris traitées en RIT flash ou RIT IP classique du ^{213}Bi .

d. Etude de la toxicité en RIT du ²¹³Bi

Pour évaluer la toxicité de la RIT flash et de la RIT IP classique au ²¹³Bi, les souris traitées ont été prélevées et une analyse NFS et un suivi pondéral effectués. Les résultats sont présentés dans la Figure 99.

Les résultats du suivi pondéral ne montrent aucune perte de poids des souris traitées sur le temps d'étude. Aussi, aucune toxicité hématologique en RIT IP classique ou en RIT flash n'est observée.

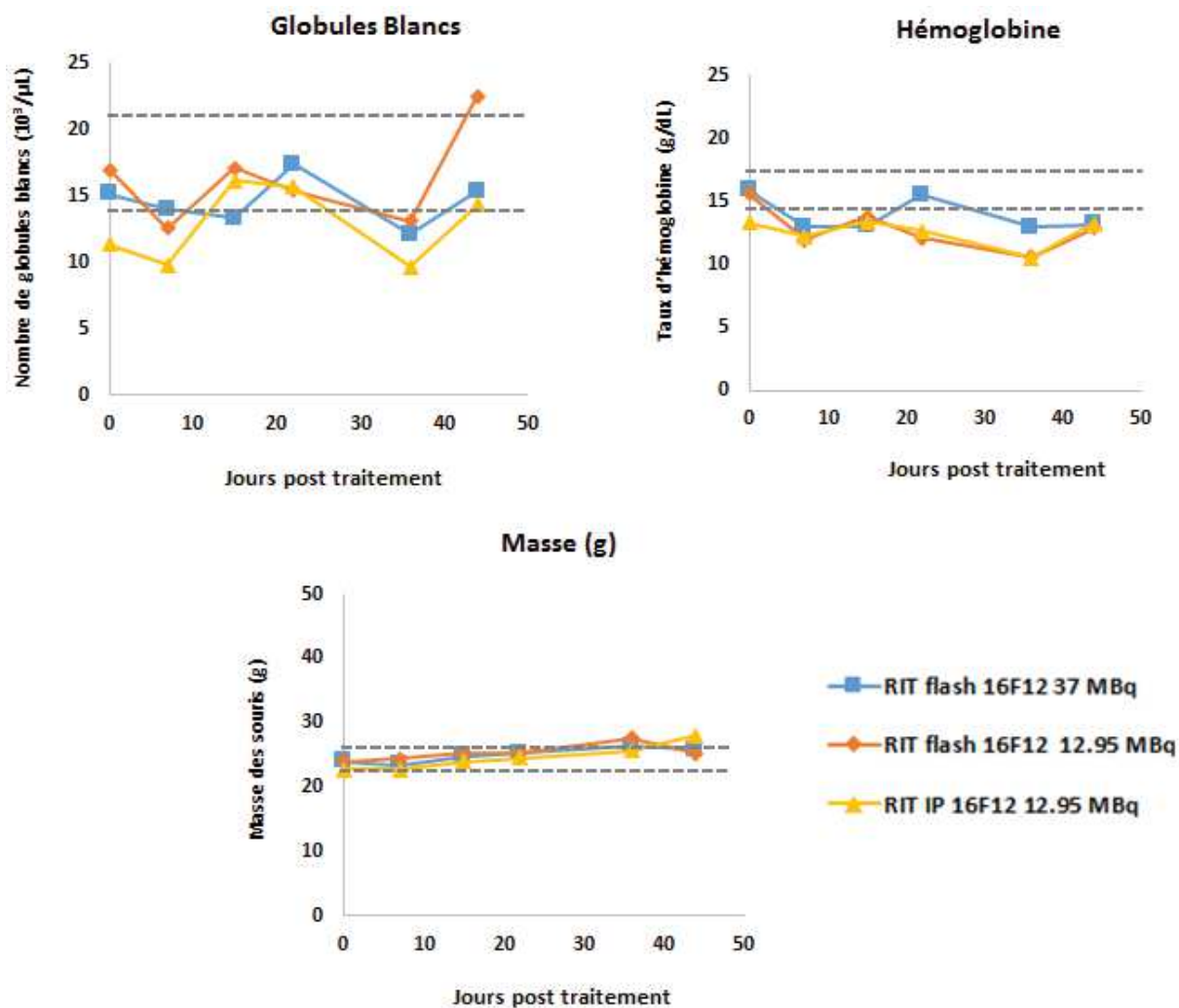


Figure 99 : étude de la toxicité en RIT au ²¹³Bi

Discussion

L'objectif de ma thèse était d'évaluer la contribution des effets ciblés et non ciblés dans le cadre d'une RIT alpha ou Auger de carcinomes péritonéaux. Pour atteindre cet objectif, des expérimentations *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées.

Les effets ciblés et non ciblés sont impliqués dans la cytotoxicité observée in vitro et in vivo en RIT alpha et Auger

Les effets ciblés de la RIT alpha et Auger ont été évalués *in vitro* par la mesure de la survie clonogénique et des lésions de l'ADN radio-induites dans les cellules traitées. Le traitement des cellules irradiées (cellules donneuses) s'est fait avec des anticorps couplés au $^{212}\text{Pb}/^{213}\text{Bi}$ (RIT alpha) et à ^{125}I (RIT Auger). Après traitement et retrait des anticorps radiomarqués, les cellules donneuses sont incubées avec du milieu frais pendant 2h. Au bout de ce temps d'incubation, ce milieu conditionné (CM) est transféré sur des cellules non irradiées (cellules receveuses) afin d'évaluer les effets non ciblés de la RIT. Les résultats de la survie clonogénique démontrent qu'en RIT alpha, la mort des cellules donneuses est principalement due aux effets de l'irradiation (effets ciblés) ; par exemple pour la RIT au ^{212}Pb , les effets ciblés contribuent à plus de 70% et pour la RIT au ^{213}Bi à plus de 50% dans la survie finale obtenue. Néanmoins, des effets non ciblés ont également été mesurés sur ces cellules donneuses démontrant ainsi leur implication dans la mort de ces cellules. Dans le cadre de la RIT Auger, on a observé que ce sont plutôt les effets non ciblés qui prédominent dans la cytotoxicité obtenue avec les ^{125}I -AcMs. La contribution mesurée des effets ciblés est beaucoup plus faible que celle obtenue avec les particules α (<15%). Par contre lorsque le noyau cellulaire est directement ciblé par l'iode 125 la contribution des effets ciblés est $\leq 50\%$. Tous ces résultats confirment la forte cytotoxicité généralement obtenue avec les émetteurs de particules alpha mais démontrent aussi la toxicité des émetteurs d'électrons Auger lorsqu'ils sont situés près ou dans le noyau des cellules ciblées [109, 405, 406].

Les dommages de l'ADN radio-induits ont par la suite été évalués. Nous avons observé dans les cellules SK-OV-3_{AMHR11} et A-431_{CEA-Luc} traitées respectivement en RIT alpha avec du ^{213}Bi et du ^{212}Pb , la formation de cassures doubles brins de l'ADN par la mesure des foci γ -H2AX et 53BP1. Ces lésions sont également observées dans les cellules receveuses témoignant de la présence d'effets non ciblés sur ces cellules non irradiées. La formation de ces DSBs diffère cependant dans les cellules donneuses et receveuses par leur nombre mais aussi par le type de lésions formées. En effet, il apparaît que les foci formés dans les cellules donneuses sont plus complexes (probablement dûs au rayonnement de fort TEL) alors que seulement des lésions simples (petits foci) sont observées dans les cellules receveuses. Ces résultats semblent en accord avec les publications de Nagasawa et Little [407–409] qui ont montré que les aberrations de type chromatides qui sont censées provenir de bases d'ADN endommagées ou des cassures simples brin étaient principalement observées dans les cellules non irradiées (effet bystander) tandis que des aberrations de type chromosomiques résultant des cassures double brin de l'ADN sont les plus observées dans les cellules irradiées. D'autres études ont également relaté la présence de dommages de l'ADN dans les cellules non irradiées [410, 411]. Par exemple Sedelnikova *et al.* [319] ont montré que dans les cellules directement irradiées, la formation des foci γ -H2AX se produit immédiatement ou juste 5 minutes après irradiation, alors

que dans les cellules bystander (cellules receveuses), cette apparition se faisait plusieurs heures après le transfert de milieu.

En complément, nous avons aussi mesuré la formation des micronoyaux (MN) par cellule binucléée. Ces micronoyaux sont liés à l'accumulation d'aberrations chromosomiques, du fait d'une mauvaise réparation des lésions de l'ADN et sont de bons indicateurs de mort mitotique. Ainsi on retrouve dans les deux types de cellules (donneuses et receveuses), la présence de MN après traitement en RIT alpha. Cela n'est vraiment pas une surprise car la présence de MN dans les cellules bystander a été prouvée dans de nombreuses études [311, 341, 412]. Dans le cadre de la RIT Auger, les mêmes observations ont été faites à savoir la présence de cassures double brins à la fois dans les cellules donneuses et receveuses.

La contribution des effets ciblés et non ciblés dans l'efficacité thérapeutique des ^{212}Pb -AcM *in vivo* a également été évaluée. Cette étude [397] a révélé une efficacité (survie) supérieure de l'anticorps ^{212}Pb -trastuzumab comparé à l'anticorps non internalisant ^{212}Pb -35A7 ; malgré une dose moyenne à la tumeur plus grande déposée par le ^{212}Pb -35A7. Pour comprendre cette absence de relation dose effet observée entre les deux anticorps, nous avons étudié la distribution de la dose à l'échelle tissulaire par l'approche de la dosimétrie voxelisée. Pour cela, la radioactivité incorporée dans les différentes tumeurs traitées, a été mesurée en utilisant le système d'imagerie par autoradiographie digitale (DAR). L'analyse des coupes tumorales par la suite, a révélé d'une très forte hétérogénéité de distribution de la radioactivité dans les tumeurs traitées avec l'anticorps ^{212}Pb -35A7. La dosimétrie voxelisée effectuée sur la base de ces images à confirmer que ces tumeurs traitées au ^{212}Pb -35A7 recevaient bien une dose supérieure par rapport aux tumeurs traitées avec le ^{212}Pb -trastuzumab, avec des valeurs en accord avec l'étude précédente. Néanmoins, si les tumeurs au ^{212}Pb -35A7 reçoivent une dose absorbée supérieure, une fraction élevée du volume de la tumeur (30%) reçoit une dose absorbée comparable à zéro qui pourrait alors expliquer son efficacité thérapeutique plus faible comparé au ^{212}Pb -trastuzumab. En prenant en compte que 30% du volume tumoral irradiée par le ^{212}Pb -35A7 ne reçoit aucune dose nous avons alors tracé la courbe de croissance prédictive de cette masse tumorale. On remarque ainsi, que ces tumeurs ont un fort retard de croissance comparé à la courbe expérimentale obtenue. De plus, nous avons montré que les dommages de l'ADN (foci 53BP1) et des mitoses anormales étaient mesurés de manière similaire dans les régions des tumeurs recevant 0 Gy ou recevant des doses absorbées élevées (> 100 Gy). Ces données suggèrent donc la présence des effets non ciblés *in vivo* également.

La forte hétérogénéité de l'anticorps non internalisant ^{212}Pb -35A7 au sein de la tumeur pourrait aussi s'expliquer par le faible parcours des particules alpha dont l'énergie émise est déposée sur place: le même anticorps (35A7) marqué avec un émetteur bêta aurait produit une distribution de dose absorbée à la tumeur plutôt uniforme (pour la même taille de tumeur étudiée) mais aussi une irradiation plus importante des tissus sains environnants. Néanmoins, cette étude nous montre que l'absence de dose principalement observée au centre des tumeurs traitées pourrait être compensée par la manifestation des effets bystander. Les travaux de Belyakov [366], qui a aussi démontré l'existence de ces effets bystander *in vivo* après une irradiation avec des particules alpha, montrent que ces effets non ciblés pourraient s'observer jusqu'à une distance de 1 mm des cellules irradiées. Cette valeur correspond au diamètre

cellulaire d'approximativement 50 à 75 cellules sachant que les tumeurs traitées dans le cadre de nos travaux font 2 – 3 mm. Cette étonnamment longue portée du signal bystander implique soit que les cellules directement endommagées produisent des facteurs solubles diffusibles de longue portée par des mécanismes autocrine/paracrine [413, 414], soit qu'un système de relais de signaux est actif dans les cellules leur permettant ainsi un transfert de signal vers les cellules voisines (signalisation juxtacrine) [302, 415].

Des résultats similaires ont été relevés lorsque le même anticorps est couplé à l'iode 125 dans le cadre d'une RIT Auger où nous observons que la distribution des foci 53BP1 n'est pas corrélée au dépôt d'énergie du ^{125}I . Comme dans le cas des particules α , la radioactivité se retrouve localisée en périphérie des tumeurs traitées. Les électrons Auger ayant un parcours encore plus faible que celui des alpha, l'existence de ces lésions ADN non loin des sites d'irradiations consolident bien cette hypothèse de l'existence des effets non ciblés *in vivo* dans nos tumeurs traitées en RIT.

Les ROS sont impliquées dans les réponses non ciblés de la RIT alpha et Auger

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS), tels que les radicaux hydroxyles, le peroxyde d'hydrogène et les anions superoxydes, sont continuellement générés par le métabolisme oxydatif normal ; l'équilibre entre la production de ces molécules oxydantes et le système antioxydant de défense permet de maintenir l'homéostasie cellulaire et tissulaire. Les ROS sont également générées au cours de la radiolyse de l'eau, et s'attaquent à l'ADN, aux protéines et aux lipides cellulaires. Ainsi, pour évaluer l'implication de ces molécules oxydantes dans les effets non ciblés observés dans les cellules non irradiées, des tests de survie clonogénique ont été réalisés en présence d'inhibiteurs de ROS. Pour les cellules traitées en RIT Auger la survie est ainsi fortement restaurée en présence de DMSO et du NAC à la fois dans les cellules irradiées (donneuses) et celles non irradiées (receveuses). Pour celles traitées en RIT alpha, on observe également une augmentation de la survie des cellules donneuses mais de façon moins prononcée que dans le cas de la RIT Auger. Par contre, l'incubation des cellules receveuses en présence de ces inhibiteurs réduit de façon significative les effets bystander et la restauration de la survie de ces cellules. Ces données suggèrent donc que les effets ciblés des RI sont les plus prépondérants dans le cadre de la RIT alpha et que la radiolyse de l'eau intervient très peu dans la mort de ces cellules irradiées.

Nos résultats indiquent donc que les ROS sont impliquées dans les effets non ciblés observés lors de la RIT alpha et Auger. Ces ROS ont été décrites en radiothérapie externe comme contribuant à la persistance du stress oxydatif dans les cellules receveuses et par conséquent sont à l'origine des dommages de l'ADN incluant la formation des MN [311, 341, 351, 412], et de foci γ -H2AX [345, 351, 411] dans ces cellules. Les cellules irradiées produisent donc des ROS et des RNS qui sont directement transmis aux cellules non irradiées *via* les jonctions communicantes ou *via* le milieu transféré [415]. Il convient aussi de signaler que ces radicaux peuvent souvent être très instables pour se rendre directement dans les cellules non irradiées voisines. En particulier se serait le cas des radicaux hydroxyles qui se désintègrent dans les nanosecondes et diffusent seulement sur quelques nanomètres. Néanmoins beaucoup de preuves existent sur la présence d'un taux élevé de ROS dans les cellules receveuses [326,

337, 372]. La membrane plasmique NAD(P)H oxydase est désignée comme principalement responsable de la persistance de production des ROS [326], et contribue effectivement aux effets non ciblés par la formation de MN aussi bien que l'induction des protéines p53 et p21^{Waf1} [311].

Le rôle des radeaux lipidiques dans les effets non ciblés de la RIT alpha et Auger

Si le ciblage direct du noyau augmente la cytotoxicité des électrons Auger, nous avons aussi démontré qu'une irradiation de la membrane par ces électrons pouvait induire une cytotoxicité non négligeable. En effet, l'irradiation de la membrane ne joue pas uniquement un rôle dans les effets ciblés, mais contribue aussi à propager les effets non ciblés. D'après le modèle de fluide mosaïque [416], la membrane contient des sphingolipides (principalement la sphingomyéline), le cholestérol et des glycophospholipides. Les sphingolipides s'associent les uns aux autres et forment avec le cholestérol, des domaines enrichis en sphingolipide et en cholestérol appelés radeaux lipidiques qui sont stabilisés dans certaines cellules par la cavéoline [417]. Il a été démontré que l'A-SMase activé par les radicaux hydroxyles [347] subit une translocation du cytoplasme vers la couche externe de la membrane cellulaire où il hydrolyse la sphingomyéline en céramide et en phosphorylcholine [419, 420]. Ces céramides forment ensuite de grandes plates-formes (radeaux lipidiques) et peuvent participer à la réorganisation spatiale des récepteurs membranaire et dans l'activation de multiples voies de signalisation. En radiothérapie externe, plusieurs mécanismes conduisant à l'activation des protéines *via* la réorganisation de la membrane ont été identifiés [421–423].

Nos résultats confirment que des mécanismes similaires pourraient être impliqués dans l'efficacité obtenue après ciblage de la membrane avec des anticorps couplés à l'¹²⁵I. En effet, nous montrons que le dépôt d'énergie localisée associée à la désintégration de l'¹²⁵I était accompagné par une activation de l'A-SMase (Figure 67), la formation du céramide (Figure 66B) et l'activation subséquente des voies de signalisation (Figure 76). Les inhibiteurs de ROS et des radeaux lipidiques tels que le MBCD ou la filipine réduisent non seulement l'effet cytotoxique ciblé de ¹²⁵I-AcM, mais aussi les effets non ciblé observés sur les cellules non irradiées (Figure 68 et Figure 77). L'utilisation de la filipine a réduit de moitié les effets ciblés des ¹²⁵I-AcM dans les cellules donneuses et de 75 à 80% dans les cellules receveuses ; démontrant ainsi l'implication des radeaux lipidiques dans les effets cytotoxiques des anticorps couplés à l'¹²⁵I. Ces résultats sont corroborés par des données *in vivo* récemment publiées par notre équipe [403] et qui montrent que le traitement en présence de MBCD supprime la signification statistique de l'efficacité thérapeutique du ¹²⁵I-35A7.

L'implication de la membrane cellulaire dans les effets non ciblés a également été observée dans les cellules donneuses traitées en RIT alpha dont les membranes n'ont pas spécifiquement été ciblées. Une augmentation de l'activité de l'A-SMase a été observée ainsi qu'une augmentation du niveau de céramide. Cette observation est en accord avec l'étude de Tartiet *et al.* [320]. En effet, ils ont montré l'existence d'effets bystander (formation de foci 53BP1) dans des cellules non irradiées après une irradiation du cytoplasme de cellules irradiées par des microfaisceaux de particules alpha. Quand les cellules donneuses sont traitées en présence de la filipine, les foci 53BP1 sont toujours observés dans ces cellules irradiées par les

particules α , mais les effets cytotoxiques sont inhibés dans les cellules non irradiées. Cela prouve donc bien que même si les particules alpha peuvent être fortement cytotoxiques, ils peuvent également déclencher chez les cellules irradiées des mécanismes impliquant la voie du céramide membranaire.

Les protéines phosphorylées associées à la RIT alpha et Auger et rôle des voies impliquant le Ca^{2+}

De multiples voies de transduction du signal activées à la suite d'une irradiation mettent en jeu la superfamille des protéines MAPK à savoir ERK1/2, JNK et p38. Divers signaux provenant de la membrane cellulaire sont connus pour activer les voies MAPK [340]. Nous avons pu démontrer dans la présente étude, l'activation des voies MAPK dans nos cellules traitées en RIT alpha ou Auger. Cette voie se retrouve également activée dans les cellules receveuses. L'activation de la protéine AKT est également observée dans les cellules donneuses et receveuses. Cette activation à la fois des protéines pro-survie (AKT, ERK1/2) et pro-apoptotique (céramide, p38 et JNK) montre ainsi la très faible balance qui existe entre les processus conduisant à une survie ou une mort des cellules. Pour les cellules irradiées, cela dépendra probablement des dommages ADN radio-induits (donc du dépôt d'énergie) alors que pour les cellules non irradiées, cela dépendra plus des facteurs solubles sécrétés (cytokines, ROS/RNS, facteurs de croissance) par les cellules irradiées. Nous avons par exemple montrée dans notre étude, que l'utilisation des inhibiteurs de p38 et de JNK était accompagnée d'une augmentation significative de la survie dans les cellules traitées en RIT Auger ; alors que l'inhibiteur de la voie ERK1/2 n'améliorait pas de façon significative la survie des cellules traitées : les voies impliquées dans la mort seraient celles qui prédominent dans notre étude. Néanmoins il existe des preuves que la MAP kinase ERK1/2 peut également activer des voies de mort en participant activement aux effets non ciblés par induction de la cyclooxygénase 2 (COX-2) [344, 424, 425]. En effet nous observons sur les cellules receveuses traitées par RIT alpha une forte expression de ERK1/2 et de COX-2. Selon Zhou [344], l'irradiation par des particules alpha de fibroblastes conduit à une forte activation de ERK1/2 dans des cellules non irradiées. La phosphorylation de cette kinase est ensuite suivie d'une forte expression de COX-2 dans ces cellules non irradiées, présentant une mutagenèse et une réduction de leur survie globale. Il a par ailleurs montré, que l'inhibition de cette voie empêche l'expression de COX-2 et supprime les effets non ciblés précédemment observés sur les cellules non irradiées.

Ce qu'il est particulièrement intéressant de signaler est que toutes les protéines activées après la RIT alpha et Auger ne sont pas identiques. Après la RIT alpha, les protéines telles que paxillin, PYK-2 et la phospholipase C γ ne sont pas activées dans les cellules donneuses ; ce qui n'est pas le cas en RIT Auger. L'activation de ces protéines en RIT Auger suggère le rôle possible des ions Ca^{2+} localisé dans les radeaux lipidiques. Le rôle du Ca^{2+} dans les effets non ciblés en radiothérapie externe a clairement été démontrée [336]. Le flux calcique extracellulaire peut être régulé par le céramide [425], mais aussi par PLC- γ . En radiothérapie externe, PLC- γ localisée à la membrane plasmique produit l'inositol triphosphate (IP3) qui conduit à la libération de Ca^{2+} retenu dans le réticulum endoplasmique via les récepteurs IP3 [426]. Une telle augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytoplasmique pourrait également

contribuer à la phosphorylation de PYK-2 observée dans nos cellules traitées en RIT Auger [427]. PYK-2, est une protéine appartenant à la famille des FAK et qui, est impliquée dans la prolifération cellulaire et la phosphorylation de paxillin. Néanmoins, l'incubation de nos cellules en présence de l'EGTA un chélateur du Ca^{2+} extracellulaire n'est accompagné d'aucune modification de la survie cellulaire. Lyng *et al.* [336] ont démontré dans leur étude l'implication de la voie calcique dans les effets bystander. Pour ce faire, ils ont montré que l'inhibition du Ca^{2+} extracellulaire par l'EGTA et le blocage des canaux calciques voltage dépendant avec la dihydropyridine (nifedipine) ou le phénylalkylamine (verapamil), supprimait totalement les effets bystander dans leur cellules traitées avec du milieu conditionné issu de cellules irradiées. Il serait donc intéressant de procéder de la même manière afin d'évaluer l'implication de cette voie dans notre modèle de RIT alpha et Auger.

Rôle des protéines de stress dans la RIT alpha du ^{213}Bi

Les protéines de stress ont également été analysées à la fois dans les cellules donneuses et receveuses traitées en utilisant la membrane commerciale de chez R & D Systems® ou par Western Blot. En RIT alpha, on observe l'activation de protéines de stress principalement dans les cellules receveuses. Ces protéines observées sont celles impliqués dans le stress oxydatif (PON2, PON3) ; l'apoptose (cytochrome C, p53) ; l'inflammation (NF- κ B, COX-2) ; l'hypoxie (HIF-1 α , HIF-2 α , Cited-2, CA9) et les protéines de survie telles que Bcl-2.

La protéine NF- κ B se retrouve activée dans les cellules donneuses traitées mais aussi chez les receveuses (Figure 78). Il s'agit d'une protéine de transcription connue pour être impliquée dans la régulation de plusieurs gènes de stress [429, 430] ; mais aussi dans les effets non ciblés (bystander) observés dans des cellules non irradiées [430, 431]. En effet, l'irradiation des cellules donneuses entraîne des dommages de l'ADN conduisant à l'activation d'ATM. ATM active ensuite la voie de signalisation de NF- κ B, qui va réguler l'expression des gènes de nombreuses cytokines et de COX-2. Les cytokines initient ensuite des voies de signalisation spécifiques dans les cellules irradiées et non irradiées résultant à une activation secondaire de NF- κ B, STAT3 et des voies MAPK avec induction subséquente de cytokines, et de l'expression des gènes COX-2 et iNOS [431]. COX-2 et iNOS participent respectivement à la réponse inflammatoire et à la production de ROS et de NO. Fait intéressant, il a été démontré que STAT3 peut maintenir de façon constitutive l'activation de NF- κ B en prolongeant sa rétention dans le noyau [432]. D'autre part, NF- κ B régule également l'expression de nombreux gènes qui contrôlent la survie cellulaire et ayant une activité anti-apoptotique tels que Bcl-2 et Bcl-X_L [433].

Les protéines induites par l'hypoxie (HIF-1 α et HIF-2 α) apparaissent activées dans les cellules receveuses. L'activation de HIF est accompagnée de l'expression de la protéine anhydrase carbonique IX (CA9) considérée comme étant l'un des marqueurs intrinsèque les plus prometteurs de l'hypoxie dans les tumeurs [434], et de Cited-2. La protéine Cited-2 agit comme un antagoniste qui réprime l'activité de HIF-1. Fait intéressant, la transcription du gène Cited-2 lui-même est activée par HIF-1 au cours de l'hypoxie. Ainsi, la protéine Cited-2 crée une boucle de rétroaction négative qui régule à la baisse la transcription du gène de HIF-1 quand les niveaux d'activité de HIF-1 sont très élevés [435].

Plusieurs études ont montré que la production de ROS pourrait conduire à l'expression de HIF-1 α dans les cellules cancéreuses [437, 438]. Paradoxalement, les niveaux de ROS intracellulaire augmentent également sous hypoxie. L'hypoxie augmente la formation des ROS par le transfert d'électrons ubiquinone à la molécule d'oxygène au niveau du site Q₀ du complexe III de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale [438].

Il est généralement admis que HIF-1 et HIF-2 contrôlent le développement tumoral en régulant l'homéostasie de l'oxygène, le métabolisme et l'apoptose [440, 441]. Parce que HIF-1 est acceptée comme un facteur de pro-survie, son rôle en tant que médiateur de l'apoptose est quelque peu controversé. Sa capacité à induire l'apoptose pourrait, dépendre de plusieurs facteurs tels que le type cellulaire, le niveau ou la durée de l'hypoxie ou la présence ou l'absence de cofacteurs. Les protéines HIF sont capables d'initier la mort cellulaire programmée, très probablement en réponse au stress hypoxique prolongée ou sévère. Un grand nombre d'études ont montré clairement un rôle de HIF-1 dans la promotion de l'apoptose [440, 442]. HIF-1 α peut induire l'apoptose par deux mécanismes. Tout d'abord, il peut augmenter la stabilité du gène suppresseur de tumeur p53. Dans des conditions de stress ou de dommages de l'ADN, p53 induit une mort cellulaire programmée en régulant des protéines telles que Bax, ou alors, provoque un arrêt du cycle qui est médiée par p21. Récemment, il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que HIF-1 α se lie directement à la ligase ubiquitaire mdm2, ce qui stabilise p53 [442, 443]. Le second mécanisme par lequel HIF-1 α peut induire l'apoptose est l'induction de plusieurs gènes cibles pro-apoptotiques comme BNIP3 (*BCL2/adenovirus E1B de 19 kDa interacting protein 3*) et NIX (*Bnip3-like protein X*) [444–446].

Dans des conditions hypoxiques, les ROS peuvent également activer des composants en amont de HIF-1 α , tels que les voies MAPK : ERK1/2, p38 et JNK. Il a été démontré que l'activation de ERK2 phosphoryle HIF-1 α *in vitro* et *in vivo* et augmente son activité transcriptionnelle [446]. Dans une étude indépendante, il a été montré que ERK2 ne phosphorylent pas directement HIF-1 α . Au lieu de cela, il phosphoryle p300/CBP favorisant alors l'interaction entre HIF-1 α et son co-activateur, améliorant ainsi la transcription [447]. D'autre part, il n'y a aucune preuve pour la phosphorylation directe de HIF-1 α par p38. D'après le modèle actuel, p38 est activée par les ROS et contribue à l'activation de HIF-1 α en inhibant son hydroxylation par les prolyl hydroxylases (PHD). Cependant, de nombreuses pièces du puzzle manquent toujours et le mécanisme exact de l'inhibition reste inconnu [448]. Enfin, des observations ont montré que JNK pourrait aussi réguler l'activité de HIF-1 α . Rezvani *et al.* [449] ont observé que la phosphorylation de HIF-1 α par JNK stimule l'apoptose induite par HIF-1 α en réponse à une irradiation UV dans des conditions normoxiques. Dans une autre étude, Kunz [450] montre que l'activation de JNK est nécessaire pour obtenir l'apoptose induite par l'hypoxie.

Au vu de tout cela, l'observation des protéines HIF en particulier de HIF-1 α dans notre étude suggère la présence d'un stress hypoxique probablement lié à la formation des ROS et/ou à l'activation des MAPK. Le rôle exact de cette protéine (induction de l'apoptose ou de la survie) n'a pas été évalué dans la présente étude. Il serait donc intéressant de l'étudier dans d'autres projets afin d'évaluer son impact sur les effets non ciblés observés dans les cellules non irradiées.

Les cytokines jouent-elles un rôle dans les effets non ciblés observés en RIT du ^{213}Bi ?

Plusieurs études ont également établi l'implication des cytokines dans les effets non ciblés. Ces cytokines sont secrétées par les cellules irradiées et contribuent à une production des ROS/RNS dans les cellules non irradiées [329]. L'interleukine-1 β (IL-1 β), le TNF- α et IL-33 par exemple activent NF- κ B qui participe à la réponse inflammatoire et à la production locale des ROS. Cette implication des cytokines dans les effets non ciblés nous a conduits à évaluer leur présence ou non dans le milieu conditionné transféré sur les cellules receveuses. Ainsi, le traitement des cellules SK-OV-3_{AMHRII} en RIT du ^{213}Bi conduit à la production des cytokines telles que ICAM-1, IL-8, la lipocaline-2 (LCN2) et de VEGF. A l'inverse, on observe une diminution de l'IL-17A, de MIF et de l'ostéopontine. L'IL-8 est une cytokine pro-inflammatoire produite par les phagocytes et les cellules du mésenchyme exposées à un stimulus ; capable d'activer les neutrophiles. Son rôle dans les effets bystander a été rapporté dans plusieurs études [287, 424, 432]. Sa présence dans les milieux transférés aux cellules receveuses pourrait alors impliquer la contribution des cytokines dans les effets non ciblés relevés au cours de cette étude.

La LCN2 (ou NGAL pour *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) est aussi une cytokine pro-inflammatoire appartenant à la famille des lipocalines qui sont de petites protéines secrétées, jouant un rôle dans divers processus biologiques comme la liaison de petites molécules hydrophobes, des interactions avec les récepteurs exprimés à la surface des cellules et la formation de complexes macromoléculaires [451]. LCN2 a d'abord été identifiée pour son interaction avec la matrice métalloprotéinase 9 (MMP-9). Elle est capable de stabiliser la MMP-9 et de la protéger de la dégradation [452]. Plusieurs études ont par la suite démontré son implication dans la prolifération cellulaire mais aussi dans l'induction de l'apoptose (pour revue voir [453]) car en effet, LCN2 a la capacité de fournir du fer (Fe^{2+}) aux cellules à partir du milieu extracellulaire [454]. Des études montrent que le fer pourrait jouer un rôle important dans le cancer et l'apoptose [455]. L'étude de Devireddy [456] montre par exemple l'induction de l'apoptose suite à la sécrétion de LCN2 dans les cellules FL5.12. En effet, cette étude démontre qu'en absence de l'IL-3, LCN2 contenue dans le CM transféré sur les cellules FL5.12 non traitées, conduit à une surexpression de son gène dans ces cellules. Une fois secrétée, LCN2 interagit avec son récepteur LCN2R en induisant l'apoptose sur ces cellules par des mécanismes autocrines. L'une des mécanismes autocrines probable a été étudiée par Guoxiong [457]. Ses travaux montrent que LCN2 fixe le fer en particulier le Fe^{2+} et que le complexe formé s'internalise dans les cellules après fixation aux récepteurs LCN2R. Fe^{2+} va ensuite réagir avec les radicaux hydroxyles du milieu intracellulaire *via* la réaction de Fenton (réaction de Haber-Weiss) conduisant à la formation plus accrue de ROS. L'apport régulier de fer par LCN2 fait répéter cette action qui aboutit à un fort stress oxydatif responsable de l'apoptose induite dans les cellules étudiées. D'autres études indépendantes ont également relatés une induction de LCN2 par NF- κ B. En effet, ces études montrent que la région promotrice de LCN2 contient des sites de fixation de plusieurs facteurs de transcription à savoir NF- κ B, STAT1, STAT3, CREB, et C/EBP β [488, 489]. Zhao [459] montre même que la MAPK ERK1/2 contrôle aussi l'expression du gène de LCN2.

D'autres études ont par contre montré que l'apport de fer dans les cellules par la LCN2 pourrait au contraire induire une prolifération des cellules et favoriser donc la tumorigenèse

[454, 461, 462]. Il est donc très important à l'avenir, de s'intéresser aux mécanismes d'action de cette cytokine dans les effets non ciblés observés au cours de notre étude.

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) s'est trouvée être la cytokine la plus exprimée par nos cellules traitées. VEGF est un médiateur majeur de l'angiogenèse et sa surexpression peut corroborer la thèse du stress hypoxique ci-dessus relaté. En effet, sa sécrétion est souvent due au manque d'oxygène dans les cellules afin de permettre la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Le lien entre l'expression de VEGF et celle de HIF-1 α a été montré dans beaucoup d'études. Par exemple il a été montré que la production de H₂O₂ stimule l'expression de p70S6K1 par l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt [462]. Une fois activée, p70S6K1 stimule l'expression de HIF-1 α qui active ensuite VEGF. Cela a été confirmé dans une autre étude [463] où les auteurs montrent que l'inhibition de mTOR par la rapamycine supprimait la voie PI3K/Akt et par conséquent l'induction de HIF-1 α et de VEGF.

L'analyse des cytokines contenue dans le CM transféré sur les cellules non irradiées, a aussi révélée une forte inhibition de l'ostéopontine (OPN) et du facteur inhibiteur de la migration des macrophages (MIF). L'OPN est une molécule initialement découverte dans le cortex osseux de bœuf, par fractionnement protéique [464], et considérée comme une molécule structurale faisant le lien entre les cellules osseuses et la matrice extracellulaire (ostéo: os, pontine : pont). On sait aujourd'hui que ces fonctions sont nombreuses [435, 436] : elles concernent classiquement la minéralisation, l'immunologie, ainsi que les pathologies cancéreuses, vasculaires et neurologiques. L'OPN est impliquée dans de nombreux cancers et est d'ailleurs considéré comme un médiateur de la tumorigenèse et de la progression du cancer [467]. Une surexpression de l'OPN a par exemple été démontrée dans le sérum de patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire [468], mais aussi chez des patients atteints du cancer du sein, de la prostate, du poumon, du côlon, et du pancréas [469]. Marqueur de sévérité de la pathologie, l'augmentation de son expression est corrélée à une charge tumorale élevée et à une forte probabilité de métastases osseuses, peut-être en raison de son tropisme osseux [492, 493]. Ces différentes observations ont conduit les auteurs de ces études à suggérer l'expression de cette protéine comme un marker de diagnostic ou de pronostic chez les patients atteints du cancer de l'ovaire, du sein, de la prostate, et du poumon [438, 442].

Concernant la protéine MIF, c'est une cytokine jouant un rôle important dans la régulation des fonctions immunologiques et inflammatoires [443–445]. Il aide les macrophages dans l'exercice de leurs fonctions qui inclut : la phagocytose, l'adhésion, la diffusion et le métabolisme. Outre ces fonctions, le MIF est considéré comme jouant également un rôle dans la prolifération cellulaire et la différenciation. L'expression de MIF a été rapportée dans plusieurs tumeurs malignes et cette expression témoigne de l'agressivité de la tumeur et de son potentiel métastatique [443, 444]. Plusieurs études qui mettent en œuvre une inhibition de l'expression de MIF dans des lignées cellulaires cancéreuses ont démontré une réduction du caractère invasif et prolifératif des tumeurs [473, 476]. De plus, MIF est capable d'inhiber les effets pro-apoptotiques exercés par la protéine suppresseur de tumeur p53 et donc inhiber l'apoptose médiée par p53 [477]. Ces résultats suggèrent donc que MIF contribue à la carcinogenèse en inactivant p53 et représente un lien important entre l'inflammation et le

développement de cancers [476, 477]. Il est aussi important de souligner que les travaux de Hagemann *et al.* ont montré une forte expression de MIF dans les cancers épithéliaux de l'ovaire [473] ce qui suggère que MIF peut être une protéine clé dans ces types de cancers. La production de MIF de façon autocrine par ces cellules cancéreuses de l'ovaire a montré une stimulation de la production de cytokines, de chimiokines et de facteurs angiogéniques qui conduisent à la croissance de ces tumeurs [473, 474].

Efficacité thérapeutique de la RIT flash versus RIT IP classique du ^{213}Bi

La RIT flash est une nouvelle technique développée dans notre équipe et qui a montré des résultats intéressants avec l'iode 125 [389]. Elle consiste en une injection IP d'une activité plus forte que celle qu'on pourrait administrer en RIT IP classique (3 – 5 fois plus), suivi plus tard d'un lavage de la cavité péritonéale afin d'éliminer toute la radioactivité non fixée aux tumeurs. Les résultats de biodistribution des souris traitées avec le ^{213}Bi -16F12 montre un ratio tumeur sur sang en faveur de la RIT flash comparé à la RIT IP classique ; avec une fixation plus grande du ^{213}Bi -16F12 dans la tumeur. La faible activité observée dans le sang après la RIT flash montre ainsi une meilleure protection des organes sains par rapport à une RIT IP classique.

Toutefois si la RIT flash améliore le ratio d'incorporation de la radioactivité dans la tumeur, l'étude de l'efficacité thérapeutique du ^{213}Bi -16F12 a montré une efficacité plus grande pour la RIT IP, même si un fort retard de croissance de la tumeur est observé. L'intérêt de cette technique est qu'elle permet une augmentation des activités injectées tout en protégeant les tissus sains. Ceci est renforcé par l'utilisation d'un radionucléide émetteur de particules α , ce qui réduit l'irradiation non spécifique. La même technique a été appliquée avec le ^{177}Lu un émetteur β^- dans le cadre de la thèse d'un autre doctorant de l'équipe. Contrairement à la RIT IP classique du ^{177}Lu -16F12, les résultats montrent que la dose délivrée par la RIT flash du ^{177}Lu -16F12 était insuffisante car, une reprise de la croissance tumorale est observée à J20 après le début du traitement. Cette observation suggère donc que la RIT flash devrait être appliquée en utilisant des radionucléides de fort TEL afin d'obtenir une meilleure efficacité comme montré avec les électrons Auger ou avec le ^{213}Bi dans la présente étude. La RIT flash du ^{213}Bi -16F12 peut donc être, un outil complémentaire dans le traitement des tumeurs solides de petites tailles en soutien à une chirurgie de réduction tumorale ou à une chimiothérapie.

Toxicité associée à la RIT alpha du ^{212}Pb / ^{213}Bi

La toxicité biochimique probable associée au traitement de RIT du ^{212}Pb a été évaluée. Aucune toxicité hépatique n'est observée. Par contre, une toxicité rénale passagère est observée avec les anticorps spécifiques couplés au ^{212}Pb . Chez les souris traitées avec le ^{213}Bi -16F12, on n'observe également aucune toxicité du radiopharmaceutique. Ces résultats sont en accord avec la plupart des études où le radionucléide utilisé est émetteur de particules α [480, 481]. Ces résultats ont néanmoins besoin d'être complétés par une analyse IHC des organes sains tels que le foie et les reins afin de confirmer/infirmer ces données.

Conclusion et perspectives

Cette étude nous a permis de mettre en évidence l'implication des effets non ciblés *in vitro* et *in vivo* dans la cytotoxicité généralement observée après une radioimmunothérapie. En effet, *in vitro* nous avons montré que même si la contribution des effets ciblés pouvait être prépondérante notamment dans le cas des émetteurs de particules α , des effets bystander jouent également un rôle dans la mort des cellules donneuses et receveuses. L'existence d'effets bystander présente un intérêt majeur dans la mesure où il est souvent très difficile de cibler toutes les cellules constituant une tumeur.

La progression du cancer vers un stade métastatique (carcinose péritonéale par exemple) réduit le taux de réussite des thérapies utilisées. Dans le cas des carcinoses péritonéales d'origine ovarienne, le pronostic vital est de 50 % à 5 ans au stade III de la pathologie alors qu'il est de 80 à 90 % lorsque le diagnostic est établi à un stade précoce de la maladie (lorsque la tumeur est limitée à l'ovaire). Malheureusement, dans 70 – 80 % des cas, le cancer ovarien est diagnostiqué à un stade tardif lorsque la maladie s'est déjà étendue à la cavité abdominale (carcinose péritonéale). A ce stade, la chirurgie et la chimiothérapie ne sont que peu efficaces à moyen terme et la mise en place d'un traitement de consolidation après la dernière cure de chimiothérapie pourrait présenter un réel intérêt. L'utilisation d'une thérapie ciblée de type IP RIT ou RIT flash utilisant des émetteurs de fort TEL (particules alpha, électrons Auger) couplé à un anticorps (12G4, 16F12) spécifiquement dirigé contre le récepteur humain de type II de l'hormone anti-Müllerienne AMHR-II pourrait constituer une alternative thérapeutique en cas de récurrence de la maladie. En plus d'une meilleure efficacité thérapeutique, la toxicité pour les tissus sains serait minimale. Nos résultats montrent que la RIT flash pourrait se substituer à la RIT IP classique lorsque le radionucléide utilisé est émetteur de particules alpha. En effet la RIT flash améliore le ratio d'incorporation du radiopharmaceutique (^{213}Bi -16F12) avec une efficacité thérapeutique élevée et une toxicité plus faible pour les tissus sains comparés à la RIT IP classique.

Aujourd'hui une version humanisée (appelée 3C23K) de l'anticorps 12G4 est évaluée dans le cadre d'une étude clinique de phase I/II en France et en Belgique. Cet anticorps est pour l'instant utilisé nu, sans couplage à un radionucléide.

Outre les effets cytotoxiques des rayonnements émis, l'existence des effets non ciblés contribue à l'efficacité thérapeutique globale obtenue. Plusieurs molécules impliquées dans la manifestation de ces effets dits non ciblés ont été mis en évidence et étudiés au cours de cette étude. Le mécanisme d'action exact ainsi que leur implication dans les différentes voies de signalisation activées reste à approfondir. Toutefois, ces données constituent une base pour l'élucidation de leur implication dans le domaine de la radiothérapie vectorisée RIT et devraient permettre à terme, d'optimiser cette stratégie thérapeutique. Les effets non ciblés, notamment les effets abscopaux ont largement été étudiés en radiothérapie externe. D'un point de vue thérapeutique, la reproduction d'un effet abscopal en exploitant la synergie entre les rayonnements ionisants et les agents immunomodulateurs visant à stimuler l'immunité antitumorale est une voie de recherche de plus en plus explorée. De nombreuses applications sont en cours de développement, notamment dans le domaine de la radiothérapie stéréotaxique hypofractionnée en contexte métastatique.

Bibliographie

- [1] G. Köhler and C. Milstein, "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity," *Nature*, vol. 256, no. 5517, pp. 495–497, Aug. 1975.
- [2] C. Regaud and A. Lacassagne, "Cellular radiosensitivity viewed in its general manifestations," *Radiophysiol Radiother*, vol. 1, pp. 95–116, 1927.
- [3] R. Siegel, D. Naishadham, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2012," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 62, no. 1, pp. 10–29, Feb. 2012.
- [4] H. Naora and D. J. Montell, "Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, no. 5, pp. 355–366, May 2005.
- [5] V. W. Chen, B. Ruiz, J. L. Killeen, T. R. Coté, X. C. Wu, and C. N. Correa, "Pathology and classification of ovarian tumors," *Cancer*, vol. 97, no. 10 Suppl, pp. 2631–2642, May 2003.
- [6] M. F. Fathalla, "Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia?," *Lancet Lond. Engl.*, vol. 2, no. 7716, p. 163, Jul. 1971.
- [7] D. W. Cramer and W. R. Welch, "Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 71, no. 4, pp. 717–721, Oct. 1983.
- [8] I. Salhi, A. Pèlerin, I. Navarro-Teulon, Université de Montpellier I, and Faculté de médecine, "Ciblage des cancers de l'ovaire par un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de type II de l'hormone anti-Müllérienne (AMHR-II)," [s.n.], S.l., 2005.
- [9] N. Colombo *et al.*, "Ovarian cancer," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 60, no. 2, pp. 159–179, Nov. 2006.
- [10] K. P. Pennington and E. M. Swisher, "Hereditary ovarian cancer: beyond the usual suspects," *Gynecol. Oncol.*, vol. 124, no. 2, pp. 347–353, Feb. 2012.
- [11] M. A. Vollebergh, J. Jonkers, and S. C. Linn, "Genomic instability in breast and ovarian cancers: translation into clinical predictive biomarkers," *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, vol. 69, no. 2, pp. 223–245, Jan. 2012.
- [12] A. Russo, V. Calò, L. Bruno, S. Rizzo, V. Bazan, and G. Di Fede, "Hereditary ovarian cancer," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 69, no. 1, pp. 28–44, Jan. 2009.
- [13] J.-H. Choi, A. S. T. Wong, H.-F. Huang, and P. C. K. Leung, "Gonadotropins and ovarian cancer," *Endocr. Rev.*, vol. 28, no. 4, pp. 440–461, Jun. 2007.
- [14] V. Goodell *et al.*, "Antibody immunity to the p53 oncogenic protein is a prognostic indicator in ovarian cancer," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 24, no. 5, pp. 762–768, Feb. 2006.
- [15] K. Schlienger *et al.*, "TRANCE- and CD40 ligand-matured dendritic cells reveal MHC class I-restricted T cells specific for autologous tumor in late-stage ovarian cancer patients," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 9, no. 4, pp. 1517–1527, Apr. 2003.
- [16] C. G. Ioannides, B. Fisk, D. Fan, W. E. Biddison, J. T. Wharton, and C. A. O'Brian, "Cytotoxic T cells isolated from ovarian malignant ascites recognize a peptide derived from the HER-2/neu proto-oncogene," *Cell. Immunol.*, vol. 151, no. 1, pp. 225–234, Oct. 1993.
- [17] S. Runz *et al.*, "Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and EpCAM," *Gynecol. Oncol.*, vol. 107, no. 3, pp. 563–571, Dec. 2007.
- [18] G. G. Garzetti, M. Cignitti, A. Ciavattini, N. Fabris, and C. Romanini, "Natural killer cell activity and progression-free survival in ovarian cancer," *Gynecol. Obstet. Invest.*, vol. 35, no. 2, pp. 118–120, 1993.
- [19] S. Zhang, X. Zhou, H. Yu, and Y. Yu, "Expression of tumor-specific antigen MAGE, GAGE and BAGE in ovarian cancer tissues and cell lines," *BMC Cancer*, vol. 10, p. 163, 2010.
- [20] L. Zhang *et al.*, "Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 348, no. 3, pp. 203–213, Jan. 2003.

- [21] L. E. Kandalaft, D. J. Powell, N. Singh, and G. Coukos, "Immunotherapy for ovarian cancer: what's next?," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 29, no. 7, pp. 925–933, Mar. 2011.
- [22] P. J. Frederick, J. M. Straughn, R. D. Alvarez, and D. J. Buchsbaum, "Preclinical studies and clinical utilization of monoclonal antibodies in epithelial ovarian cancer," *Gynecol. Oncol.*, vol. 113, no. 3, pp. 384–390, Jun. 2009.
- [23] C. C. Preston, E. L. Goode, L. C. Hartmann, K. R. Kalli, and K. L. Knutson, "Immunity and immune suppression in human ovarian cancer," *Immunotherapy*, vol. 3, no. 4, pp. 539–556, Apr. 2011.
- [24] N. Leffers *et al.*, "Antigen-specific active immunotherapy for ovarian cancer," *Cochrane Database Syst. Rev.*, no. 1, p. CD007287, 2010.
- [25] V. Lavoué *et al.*, "Sensitization of ovarian carcinoma cells with zoledronate restores the cytotoxic capacity of V γ 9V δ 2 T cells impaired by the prostaglandin E2 immunosuppressive factor: implications for immunotherapy," *Int. J. Cancer*, vol. 131, no. 4, pp. E449–462, Aug. 2012.
- [26] Y. Aoki *et al.*, "Use of adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes alone or in combination with cisplatin-containing chemotherapy in patients with epithelial ovarian cancer," *Cancer Res.*, vol. 51, no. 7, pp. 1934–1939, Apr. 1991.
- [27] M. J. Dobrzanski *et al.*, "Autologous MUC1-specific Th1 effector cell immunotherapy induces differential levels of systemic TReg cell subpopulations that result in increased ovarian cancer patient survival," *Clin. Immunol. Orlando Fla*, vol. 133, no. 3, pp. 333–352, Dec. 2009.
- [28] M. L. Disis *et al.*, "Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 20, no. 11, pp. 2624–2632, Jun. 2002.
- [29] N. Leffers *et al.*, "Immunization with a P53 synthetic long peptide vaccine induces P53-specific immune responses in ovarian cancer patients, a phase II trial," *Int. J. Cancer*, vol. 125, no. 9, pp. 2104–2113, Nov. 2009.
- [30] C. S. M. Diefenbach *et al.*, "Safety and immunogenicity study of NY-ESO-1b peptide and montanide ISA-51 vaccination of patients with epithelial ovarian cancer in high-risk first remission," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 14, no. 9, pp. 2740–2748, May 2008.
- [31] K. Odunsi *et al.*, "Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA class I/II specificities induces integrated humoral and T cell responses in ovarian cancer," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 31, pp. 12837–12842, Jul. 2007.
- [32] K. A. Chianese-Bullock *et al.*, "A multi-peptide vaccine is safe and elicits T-cell responses in participants with advanced stage ovarian cancer," *J. Immunother. Hagerstown Md 1997*, vol. 31, no. 4, pp. 420–430, May 2008.
- [33] J. J. Hernando *et al.*, "Vaccination with dendritic cells transfected with mRNA-encoded folate-receptor-alpha for relapsed metastatic ovarian cancer," *Lancet Oncol.*, vol. 8, no. 5, pp. 451–454, May 2007.
- [34] L. E. Kandalaft *et al.*, "Autologous lysate-pulsed dendritic cell vaccination followed by adoptive transfer of vaccine-primed ex vivo co-stimulated T cells in recurrent ovarian cancer," *Oncoimmunology*, vol. 2, no. 1, p. e22664, Jan. 2013.
- [35] R. L. Klein *et al.*, "Ovarian cancer metastatic to the breast presenting as inflammatory breast cancer: a case report and literature review," *J. Cancer*, vol. 1, pp. 27–31, 2010.
- [36] H.-D. Sun *et al.*, "Brain metastasis of ovarian epithelial carcinoma," *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 49, no. 1, pp. 101–104, Mar. 2010.

- [37] P. Dube, P. Lasser, and D. Elias, "Traitement de la carcinose péritonéale d'origine colorectale : Carcinose péritonéale," *J. Chir. (Paris)*, vol. 134, no. 5–6, pp. 233–236, 1997.
- [38] C. Arvieux *et al.*, "Découverte per-opératoire d'une carcinose péritonéale : Analyse des attitudes chirurgicales," in *Lyon chirurgical*, 1996, vol. 92, pp. 266–274.
- [39] P. H. Sugarbaker and K. A. Jablonski, "Prognostic features of 51 colorectal and 130 appendiceal cancer patients with peritoneal carcinomatosis treated by cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy," *Ann. Surg.*, vol. 221, no. 2, pp. 124–132, Feb. 1995.
- [40] B. Detroz, D. Elias, E. Damia, B. Debaene, P. Rougier, and P. Lasser, "[Intraperitoneal hyperthermic chemotherapy (IPHC), a promising treatment of peritoneal carcinomatosis]," *Bull. Cancer (Paris)*, vol. 81, no. 3, pp. 182–193, Mar. 1994.
- [41] B. Mansvelt *et al.*, "[Study of the toxicity and results of intraperitoneal hyperthermic chemotherapy in 28 patients with peritoneal carcinomatosis]," *Ann. Chir.*, vol. 51, no. 1, pp. 60–67, 1997.
- [42] Y. Yonemura *et al.*, "Effects of intraoperative chemohyperthermia in patients with gastric cancer with peritoneal dissemination," *Surgery*, vol. 119, no. 4, pp. 437–444, Apr. 1996.
- [43] J. Esquivel, J. Vidal-Jove, M. A. Steves, and P. H. Sugarbaker, "Morbidity and mortality of cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy," *Surgery*, vol. 113, no. 6, pp. 631–636, Jun. 1993.
- [44] R. Hamazoe, M. Maeta, and N. Kaibara, "Intraperitoneal thermochemotherapy for prevention of peritoneal recurrence of gastric cancer. Final results of a randomized controlled study," *Cancer*, vol. 73, no. 8, pp. 2048–2052, Apr. 1994.
- [45] D. Elias *et al.*, "Treatment of peritoneal carcinomatosis by intraperitoneal chemohyperthermia: reliable and unreliable concepts," *Hepatogastroenterology.*, vol. 41, no. 3, pp. 207–213, Jun. 1994.
- [46] G. M. Hahn, "Potential for therapy of drugs and hyperthermia," *Cancer Res.*, vol. 39, no. 6 Pt 2, pp. 2264–2268, Jun. 1979.
- [47] T. Shimizu, M. Maeta, and S. Koga, "Influence of local hyperthermia on the healing of small intestinal anastomoses in the rat," *Br. J. Surg.*, vol. 78, no. 1, pp. 57–59, Jan. 1991.
- [48] J. A. Visser, "AMH signaling: from receptor to target gene," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 211, no. 1–2, pp. 65–73, Dec. 2003.
- [49] O. Cohen-Haguenaer *et al.*, "Mapping of the gene for anti-müllerian hormone to the short arm of human chromosome 19," *Cytogenet. Cell Genet.*, vol. 44, no. 1, pp. 2–6, 1987.
- [50] C. Belville, S. P. Jamin, J.-Y. Picard, N. Josso, and N. di Clemente, "Role of type I receptors for anti-Müllerian hormone in the SMAT-1 Sertoli cell line," *Oncogene*, vol. 24, no. 31, pp. 4984–4992, Jul. 2005.
- [51] J. Y. Song *et al.*, "The expression of Müllerian inhibiting substance/anti-Müllerian hormone type II receptor protein and mRNA in benign, borderline and malignant ovarian neoplasia," *Int. J. Oncol.*, vol. 34, no. 6, pp. 1583–1591, Jun. 2009.
- [52] S. Imbeaud *et al.*, "Insensitivity to anti-Müllerian hormone due to a mutation in the human anti-Müllerian hormone receptor," *Nat. Genet.*, vol. 11, no. 4, pp. 382–388, Dec. 1995.
- [53] E. L. A. F. van Houten, A. P. N. Themmen, and J. A. Visser, "Anti-Müllerian hormone (AMH): Regulator and marker of ovarian function," *Ann. Endocrinol.*, vol. 71, no. 3, pp. 191–197, May 2010.

- [54] I. Zec, D. Tislaric-Medenjak, Z. B. Megla, and I. Kucak, "Anti-Müllerian hormone: a unique biochemical marker of gonadal development and fertility in humans," *Biochem. Medica*, vol. 21, no. 3, pp. 219–230, 2011.
- [55] R. R. Behringer, R. L. Cate, G. J. Froelick, R. D. Palmiter, and R. L. Brinster, "Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing Müllerian inhibiting substance," *Nature*, vol. 345, no. 6271, pp. 167–170, May 1990.
- [56] P. T. Masiakos *et al.*, "Human ovarian cancer, cell lines, and primary ascites cells express the human Mullerian inhibiting substance (MIS) type II receptor, bind, and are responsive to MIS," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 5, no. 11, pp. 3488–3499, Nov. 1999.
- [57] J. N. Bakkum-Gamez *et al.*, "Müllerian inhibiting substance type II receptor (MISIIR): a novel, tissue-specific target expressed by gynecologic cancers," *Gynecol. Oncol.*, vol. 108, no. 1, pp. 141–148, Jan. 2008.
- [58] E. J. Renaud, D. T. MacLaughlin, E. Oliva, B. R. Rueda, and P. K. Donahoe, "Endometrial cancer is a receptor-mediated target for Mullerian Inhibiting Substance," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 1, pp. 111–116, Jan. 2005.
- [59] A. E. Stephen, P. T. Masiakos, D. L. Segev, J. P. Vacanti, P. K. Donahoe, and D. T. MacLaughlin, "Tissue-engineered cells producing complex recombinant proteins inhibit ovarian cancer in vivo," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 6, pp. 3214–3219, Mar. 2001.
- [60] A. E. Stephen, L. A. Pearsall, B. P. Christian, P. K. Donahoe, J. P. Vacanti, and D. T. MacLaughlin, "Highly purified müllerian inhibiting substance inhibits human ovarian cancer in vivo," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 8, no. 8, pp. 2640–2646, Aug. 2002.
- [61] D. C. Connolly *et al.*, "Female mice chimeric for expression of the simian virus 40 TAG under control of the MISIIR promoter develop epithelial ovarian cancer," *Cancer Res.*, vol. 63, no. 6, pp. 1389–1397, Mar. 2003.
- [62] Q. Yuan, H. H. Simmons, M. K. Robinson, M. Russeva, W. A. Marasco, and G. P. Adams, "Development of engineered antibodies specific for the Müllerian inhibiting substance type II receptor: a promising candidate for targeted therapy of ovarian cancer," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 5, no. 8, pp. 2096–2105, Aug. 2006.
- [63] R. Pieretti-Vanmarcke *et al.*, "Recombinant human Mullerian inhibiting substance inhibits long-term growth of MIS type II receptor-directed transgenic mouse ovarian cancers in vivo," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 12, no. 5, pp. 1593–1598, Mar. 2006.
- [64] R. Pieretti-Vanmarcke *et al.*, "Mullerian Inhibiting Substance enhances subclinical doses of chemotherapeutic agents to inhibit human and mouse ovarian cancer," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 46, pp. 17426–17431, Nov. 2006.
- [65] D. M. Goldenberg, "Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 43, no. 5, pp. 693–713, May 2002.
- [66] D. G. Maloney *et al.*, "IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma," *Blood*, vol. 90, no. 6, pp. 2188–2195, Sep. 1997.
- [67] M. S. Kaminski *et al.*, "Multicenter phase III study of iodine-131 tositumomab (anti-B1 antibody) for chemotherapy-refractory low-grade or transformed low-grade non-Hodgkin's lymphoma (NHL)," in *Blood*, 1998, vol. 92, p. 316A–316A.
- [68] J. W. Friedberg, "Radioimmunotherapy for non-Hodgkin's lymphoma," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 10, no. 23, pp. 7789–7791, Dec. 2004.
- [69] D. L. Morris, H. G. Jeong, S. D. Jordan, N. E. Kaminski, and M. P. Holsapple, "Characterization of the effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in B6C3F1 and

- DBA/2 mice following single and repeated exposures,” *Arch. Toxicol.*, vol. 72, no. 3, pp. 157–168, Feb. 1998.
- [70] J. M. Vose *et al.*, “Multicenter phase II study of iodine-131 tositumomab for chemotherapy-relapsed/refractory low-grade and transformed low-grade B-cell non-Hodgkin’s lymphomas,” *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 18, no. 6, pp. 1316–1323, Mar. 2000.
- [71] M. S. Kaminski *et al.*, “Re-treatment with I-131 tositumomab in patients with non-Hodgkin’s lymphoma who had previously responded to I-131 tositumomab,” *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 23, no. 31, pp. 7985–7993, Nov. 2005.
- [72] G. A. Wiseman *et al.*, “Phase I/II 90Y-Zevalin (yttrium-90 ibritumomab tiuxetan, IDEC-Y2B8) radioimmunotherapy dosimetry results in relapsed or refractory non-Hodgkin’s lymphoma,” *Eur. J. Nucl. Med.*, vol. 27, no. 7, pp. 766–777, Jul. 2000.
- [73] T. E. Witzig, “The use of ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy for patients with relapsed B-cell non-Hodgkin’s lymphoma,” *Semin. Oncol.*, vol. 27, no. 6 Suppl 12, pp. 74–78, Dec. 2000.
- [74] J. G. Jurcic *et al.*, “Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia,” *Blood*, vol. 100, no. 4, pp. 1233–1239, Aug. 2002.
- [75] W. J. G. Oyen *et al.*, “Targeted therapy in nuclear medicine—current status and future prospects,” *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO*, vol. 18, no. 11, pp. 1782–1792, Nov. 2007.
- [76] M. Mahé and J. F. Chatal, “[Radioimmunotherapy in the treatment of cancers],” *Bull. Cancer (Paris)*, vol. 81, no. 9, pp. 788–799, Sep. 1994.
- [77] G. L. DeNardo *et al.*, “Strategies for developing effective radioimmunotherapy for solid tumors,” *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 5, no. 10 Suppl, p. 3219s–3223s, Oct. 1999.
- [78] A. A. Epenetos, V. Hird, H. Lambert, P. Mason, and C. Coulter, “Long term survival of patients with advanced ovarian cancer treated with intraperitoneal radioimmunotherapy,” *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.*, vol. 10, no. S1, pp. 44–46, Jan. 2000.
- [79] D. A. Reardon *et al.*, “Phase II trial of murine (131)I-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 administered into surgically created resection cavities of patients with newly diagnosed malignant gliomas,” *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 20, no. 5, pp. 1389–1397, Mar. 2002.
- [80] M. Bardiès *et al.*, “Bispecific antibody and iodine-131-labeled bivalent hapten dosimetry in patients with medullary thyroid or small-cell lung cancer,” *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 37, no. 11, pp. 1853–1859, Nov. 1996.
- [81] D. M. Goldenberg, “Advancing role of radiolabeled antibodies in the therapy of cancer,” *Cancer Immunol. Immunother. CII*, vol. 52, no. 5, pp. 281–296, May 2003.
- [82] A. F. Williams and A. N. Barclay, “The immunoglobulin superfamily—domains for cell surface recognition,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 6, pp. 381–405, 1988.
- [83] H. W. Schroeder and L. Cavacini, “Structure and function of immunoglobulins,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 125, no. 2 Suppl 2, pp. S41–52, Feb. 2010.
- [84] J. Novotný, R. Brucoleri, J. Newell, D. Murphy, E. Haber, and M. Karplus, “Molecular anatomy of the antibody binding site,” *J. Biol. Chem.*, vol. 258, no. 23, pp. 14433–14437, Dec. 1983.
- [85] T. Suzuki *et al.*, “Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human neonatal FcR,” *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 184, no. 4, pp. 1968–1976, Feb. 2010.

- [86] P. Holliger and P. J. Hudson, "Engineered antibody fragments and the rise of single domains," *Nat. Biotechnol.*, vol. 23, no. 9, pp. 1126–1136, Sep. 2005.
- [87] C. Ortega, "Ingénierie de fragments d'anticorps pour l'imagerie in vivo de cancers de la sphère génitale," phdthesis, Université Paris Sud - Paris XI, 2012.
- [88] G. M. Bartelds *et al.*, "Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up," *JAMA*, vol. 305, no. 14, pp. 1460–1468, Apr. 2011.
- [89] H. Mitoma *et al.*, "Mechanisms for cytotoxic effects of anti-tumor necrosis factor agents on transmembrane tumor necrosis factor alpha-expressing cells: comparison among infliximab, etanercept, and adalimumab," *Arthritis Rheum.*, vol. 58, no. 5, pp. 1248–1257, May 2008.
- [90] G. Paintaud, M. Diviné, and P. Lechat, "Anticorps monoclonaux à usage thérapeutique : spécificités du développement clinique, évaluation par les agences, suivi de la tolérance à long terme," *Thérapie*, vol. 67, no. 4, pp. 319–327, Jul. 2012.
- [91] R. Beliard *et al.*, "A human anti-D monoclonal antibody selected for enhanced FcγRIII engagement clears RhD⁺ autologous red cells in human volunteers as efficiently as polyclonal anti-D antibodies," *Br. J. Haematol.*, vol. 141, no. 1, pp. 109–119, Apr. 2008.
- [92] T. C. Karagiannis, "Comparison of different classes of radionuclides for potential use in radioimmunotherapy," *Hell. J. Nucl. Med.*, vol. 10, no. 2, pp. 82–88, Aug. 2007.
- [93] F. Buchegger, F. Perillo-Adamer, Y. M. Dupertuis, and A. B. Delaloye, "Auger radiation targeted into DNA: a therapy perspective," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 33, no. 11, pp. 1352–1363, Nov. 2006.
- [94] K. S. Sastry, "Biological effects of the Auger emitter iodine-125: A review. Report No. 1 of AAPM Nuclear Medicine Task Group No. 6," *Med. Phys.*, vol. 19, no. 6, pp. 1361–1370, 1992.
- [95] R. W. Howell, "Radiation spectra for Auger-electron emitting radionuclides: Report No. 2 of AAPM Nuclear Medicine Task Group No. 6," *Med. Phys.*, vol. 19, no. 6, pp. 1371–1383, Nov. 1992.
- [96] S. Aghevlian, A. J. Boyle, and R. M. Reilly, "Radioimmunotherapy of cancer with high linear energy transfer (LET) radiation delivered by radionuclides emitting α -particles or Auger electrons," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Dec. 2015.
- [97] J. Schwartz *et al.*, "Renal uptake of bismuth-213 and its contribution to kidney radiation dose following administration of actinium-225-labeled antibody," *Phys. Med. Biol.*, vol. 56, no. 3, p. 721, 2011.
- [98] R. H. Larsen, S. Slade, and M. R. Zalutsky, "Blocking [211At]astatide accumulation in normal tissues: preliminary evaluation of seven potential compounds," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 25, no. 4, pp. 351–357, May 1998.
- [99] D. J. Hnatowich, "The in vivo uses of streptavidin and biotin: a short progress report," *Nucl. Med. Commun.*, vol. 15, no. 8, pp. 575–577, Aug. 1994.
- [100] H. B. Breitz *et al.*, "Clinical optimization of pretargeted radioimmunotherapy with antibody-streptavidin conjugate and 90Y-DOTA-biotin," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 41, no. 1, pp. 131–140, Jan. 2000.
- [101] S. J. Knox *et al.*, "Phase II trial of yttrium-90-DOTA-biotin pretargeted by NR-LU-10 antibody/streptavidin in patients with metastatic colon cancer," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 6, no. 2, pp. 406–414, Feb. 2000.
- [102] J. Barbet, F. Kraeber-Bodéré, J. P. Vuillez, E. Gautherot, E. Rouvier, and J. F. Chatal, "Pretargeting with the affinity enhancement system for radioimmunotherapy," *Cancer Biother. Radiopharm.*, vol. 14, no. 3, pp. 153–166, Jun. 1999.

- [103] E. Rouvier, E. Gautherot, P. Meyer, and J. Barbet, "Targeting medullary thyroid carcinomas with bispecific antibodies and bivalent haptens. Results and clinical perspectives," *Horm. Res.*, vol. 47, no. 4–6, pp. 163–167, 1997.
- [104] S. Supiot *et al.*, "Gemcitabine radiosensitizes multiple myeloma cells to low let, but not high let, irradiation," *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.*, vol. 83, no. 1, pp. 97–101, Apr. 2007.
- [105] J. P. Pouget and S. J. Mather, "General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation," *Eur. J. Nucl. Med.*, vol. 28, no. 4, pp. 541–561, Apr. 2001.
- [106] G. Sgouros *et al.*, "MIRD Pamphlet No. 22 (abridged): radiobiology and dosimetry of alpha-particle emitters for targeted radionuclide therapy," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 51, no. 2, pp. 311–328, Feb. 2010.
- [107] A. I. Kassis, "Therapeutic radionuclides: biophysical and radiobiologic principles," *Semin. Nucl. Med.*, vol. 38, no. 5, pp. 358–366, Sep. 2008.
- [108] A. I. Kassis, "Molecular and cellular radiobiological effects of Auger emitting radionuclides," *Radiat. Prot. Dosimetry*, vol. 143, no. 2–4, pp. 241–247, Feb. 2011.
- [109] M. A. Walicka, G. Vaidyanathan, M. R. Zalutsky, S. J. Adelstein, and A. I. Kassis, "Survival and DNA damage in Chinese hamster V79 cells exposed to alpha particles emitted by DNA-incorporated astatine-211," *Radiat. Res.*, vol. 150, no. 3, pp. 263–268, Sep. 1998.
- [110] A. I. Kassis, C. R. Harris, S. J. Adelstein, T. J. Ruth, R. Lambrecht, and A. P. Wolf, "The in vitro radiobiology of astatine-211 decay," *Radiat. Res.*, vol. 105, no. 1, pp. 27–36, Jan. 1986.
- [111] D. J. Kwекkeboom *et al.*, "Radiolabeled somatostatin analog [177Lu-DOTA0,Tyr3]octreotate in patients with endocrine gastroenteropancreatic tumors," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 23, no. 12, pp. 2754–2762, Apr. 2005.
- [112] D. M. Goldenberg, "Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 43, no. 5, pp. 693–713, May 2002.
- [113] Jean Yves Giguere and Louise Joly, *Radioprotection en radiodiagnostic – 3e édition*, 3ème. CCDMD.
- [114] Hall EJ, *Radiobiology for the Radiologist*. Philadelphia, PA: JB Lippincott Co.; 1994:118.
- [115] G. W. Barendsen, "MODIFICATION OF RADIATION DAMAGE BY FRACTIONATION OF THE DOSE, ANOXIA, AND CHEMICAL PROTECTORS IN RELATION TO LET," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 114, no. 1, pp. 96–114, Dec. 2006.
- [116] A. Bishayee, D. V. Rao, L. G. Bouchet, W. E. Bolch, and R. W. Howell, "Protection by DMSO against cell death caused by intracellularly localized iodine-125, iodine-131 and polonium-210," *Radiat. Res.*, vol. 153, no. 4, pp. 416–427, Apr. 2000.
- [117] R. W. Howell, S. M. Goddu, V. R. Narra, D. R. Fisher, R. E. Schenter, and D. V. Rao, "Radiotoxicity of gadolinium-148 and radium-223 in mouse testes: relative biological effectiveness of alpha-particle emitters in vivo," *Radiat. Res.*, vol. 147, no. 3, pp. 342–348, Mar. 1997.
- [118] M. T. Azure, R. D. Archer, K. S. Sastry, D. V. Rao, and R. W. Howell, "Biological effect of lead-212 localized in the nucleus of mammalian cells: role of recoil energy in the radiotoxicity of internal alpha-particle emitters," *Radiat. Res.*, vol. 140, no. 2, pp. 276–283, Nov. 1994.
- [119] E. A. Blakely and A. Kronenberg, "Heavy-ion radiobiology: new approaches to delineate mechanisms underlying enhanced biological effectiveness," *Radiat. Res.*, vol. 150, no. 5 Suppl, pp. S126-145, Nov. 1998.
- [120] M. S. Wicha, "Cancer stem cells and metastasis: lethal seeds," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 12, no. 19, pp. 5606–5607, Oct. 2006.

- [121] G. Sgouros and H. Song, "Cancer stem cell targeting using the alpha-particle emitter, ^{213}Bi : mathematical modeling and feasibility analysis," *Cancer Biother. Radiopharm.*, vol. 23, no. 1, pp. 74–81, Feb. 2008.
- [122] J. Elgqvist *et al.*, "Therapeutic efficacy and tumor dose estimations in radioimmunotherapy of intraperitoneally growing OVCAR-3 cells in nude mice with (^{211}At) -labeled monoclonal antibody MX35," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 46, no. 11, pp. 1907–1915, Nov. 2005.
- [123] J. Elgqvist *et al.*, "Alpha-radioimmunotherapy of intraperitoneally growing OVCAR-3 tumors of variable dimensions: Outcome related to measured tumor size and mean absorbed dose," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 47, no. 8, pp. 1342–1350, Aug. 2006.
- [124] M. R. Zalutsky *et al.*, "Clinical experience with alpha-particle emitting ^{211}At : treatment of recurrent brain tumor patients with ^{211}At -labeled chimeric antitenascin monoclonal antibody 81C6," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 49, no. 1, pp. 30–38, Jan. 2008.
- [125] J. G. Jurcic *et al.*, "Targeted alpha-particle therapy for myeloid leukemias: A phase I trial of bismuth- ^{213}Bi -HuM195 (anti-CD33)," in *Blood*, 1997, vol. 90, pp. 2245–2245.
- [126] M. W. Geerlings, F. M. Kaspersen, C. Apostolidis, and R. van der Hout, "The feasibility of ^{225}Ac as a source of alpha-particles in radioimmunotherapy," *Nucl. Med. Commun.*, vol. 14, no. 2, pp. 121–125, Feb. 1993.
- [127] S. Kneifel *et al.*, "Local targeting of malignant gliomas by the diffusible peptidic vector 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-glutaric acid-4,7,10-triacetic acid-substance p," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 12, no. 12, pp. 3843–3850, Jun. 2006.
- [128] C. Raja *et al.*, "Interim analysis of toxicity and response in phase 1 trial of systemic targeted alpha therapy for metastatic melanoma," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 6, no. 6, pp. 846–852, Jun. 2007.
- [129] S. Heeger *et al.*, "Alpha-radioimmunotherapy of B-lineage non-Hodgkin's lymphoma using ^{213}Bi -labelled anti-CD19-and anti-CD20-CHX-A"-DTPA conjugates," in *ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, 2003, vol. 225, pp. U261–U261.
- [130] M. R. Zalutsky, R. E. McLendon, P. K. Garg, G. E. Archer, J. M. Schuster, and D. D. Bigner, "Radioimmunotherapy of neoplastic meningitis in rats using an alpha-particle-emitting immunoconjugate," *Cancer Res.*, vol. 54, no. 17, pp. 4719–4725, Sep. 1994.
- [131] R. Meredith *et al.*, "Dose Escalation and Dosimetry of First-in-Human α Radioimmunotherapy with ^{212}Pb -TCMC-Trastuzumab," *J. Nucl. Med.*, p. jnumed.114.143842, Aug. 2014.
- [132] K. E. Baidoo, K. Yong, and M. W. Brechbiel, "Molecular pathways: targeted α -particle radiation therapy," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 19, no. 3, pp. 530–537, Feb. 2013.
- [133] T. M. Behr *et al.*, "Therapeutic efficacy and dose-limiting toxicity of Auger-electron vs. beta emitters in radioimmunotherapy with internalizing antibodies: evaluation of ^{125}I - vs. ^{131}I -labeled CO17-1A in a human colorectal cancer model," *Int. J. Cancer*, vol. 76, no. 5, pp. 738–748, May 1998.
- [134] T. M. Behr *et al.*, "Therapeutic advantages of Auger electron- over beta-emitting radiometals or radioiodine when conjugated to internalizing antibodies," *Eur. J. Nucl. Med.*, vol. 27, no. 7, pp. 753–765, Jul. 2000.
- [135] E. C. Barendswaard *et al.*, "Relative therapeutic efficacy of (^{125}I) - and (^{131}I) -labeled monoclonal antibody A33 in a human colon cancer xenograft," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 42, no. 8, pp. 1251–1256, Aug. 2001.

- [136] R. Ochakovskaya, L. Osorio, D. M. Goldenberg, and M. J. Mattes, "Therapy of disseminated B-cell lymphoma xenografts in severe combined immunodeficient mice with an anti-CD74 antibody conjugated with (111)indium, (67)gallium, or (90)yttrium," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 7, no. 6, pp. 1505–1510, Jun. 2001.
- [137] R. B. Michel, M. W. Brechbiel, and M. J. Mattes, "A comparison of 4 radionuclides conjugated to antibodies for single-cell kill," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 44, no. 4, pp. 632–640, Apr. 2003.
- [138] R. B. Michel, A. V. Rosario, P. M. Andrews, D. M. Goldenberg, and M. J. Mattes, "Therapy of small subcutaneous B-lymphoma xenografts with antibodies conjugated to radionuclides emitting low-energy electrons," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 11, no. 2 Pt 1, pp. 777–786, Jan. 2005.
- [139] L. Santoro, "Évaluation de l'efficacité des émetteurs d'électrons Auger dans le traitement des tumeurs solides de petite taille par radioimmunothérapie," Montpellier 1, 2008.
- [140] J.-P. Pouget *et al.*, "Cell membrane is a more sensitive target than cytoplasm to dense ionization produced by auger electrons," *Radiat. Res.*, vol. 170, no. 2, pp. 192–200, Aug. 2008.
- [141] R. F. Meredith *et al.*, "Initial clinical evaluation of iodine-125-labeled chimeric 17-1A for metastatic colon cancer," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 36, no. 12, pp. 2229–2233, Dec. 1995.
- [142] S. Welt *et al.*, "Phase I/II study of iodine 125-labeled monoclonal antibody A33 in patients with advanced colon cancer," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 14, no. 6, pp. 1787–1797, Jun. 1996.
- [143] J. G. Emrich *et al.*, "Radioiodinated (I-125) monoclonal antibody 425 in the treatment of high grade glioma patients: ten-year synopsis of a novel treatment," *Am. J. Clin. Oncol.*, vol. 25, no. 6, pp. 541–546, Dec. 2002.
- [144] G. M. Makrigiorgos *et al.*, "Radiotoxicity of 5-[123I]iodo-2'-deoxyuridine in V79 cells: a comparison with 5-[125I]iodo-2'-deoxyuridine," *Radiat. Res.*, vol. 118, no. 3, pp. 532–544, Jun. 1989.
- [145] K. S. R. Sastry *et al.*, "Dosimetry of Auger emitters: physical and phenomenological approaches," Massachusetts Univ., Amherst (USA). Dept. of Physics and Astronomy; University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Newark (USA). Dept. of Radiology; Harvard Univ., Boston, MA (USA). Shields Warren Radiation Lab.; Oak Ridge National Lab., TN (USA), 1987.
- [146] E. Pomplun, J. Booz, and D. E. Charlton, "A Monte Carlo simulation of Auger cascades," *Radiat. Res.*, vol. 111, no. 3, pp. 533–552, Sep. 1987.
- [147] L. f. Mausner, R. f. Straub, and S. c. Srivastava, "The in vivo generator for radioimmunotherapy," *J. Label. Compd. Radiopharm.*, vol. 26, no. 1–12, pp. 498–500, Jan. 1989.
- [148] K. Yong and M. W. Brechbiel, "Towards translation of 212Pb as a clinical therapeutic; getting the lead in!," *Dalton Trans. Camb. Engl. 2003*, vol. 40, no. 23, pp. 6068–6076, Jun. 2011.
- [149] K. E. Baidoo, D. E. Milenic, and M. W. Brechbiel, "Methodology for labeling proteins and peptides with lead-212 (212Pb)," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 40, no. 5, pp. 592–599, Jul. 2013.
- [150] F.-M. Su, P. Beaumier, D. Axworthy, R. Atcher, and A. Fritzberg, "Pretargeted radioimmunotherapy in tumored mice using an in vivo 212Pb/212Bi generator," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 32, no. 7, pp. 741–747, Oct. 2005.
- [151] K. J. Yong, D. E. Milenic, K. E. Baidoo, and M. W. Brechbiel, "(212)Pb-radioimmunotherapy induces G(2) cell-cycle arrest and delays DNA damage repair in

- tumor xenografts in a model for disseminated intraperitoneal disease,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 11, no. 3, pp. 639–648, Mar. 2012.
- [152] D. E. Milenic *et al.*, “Targeting of HER2 antigen for the treatment of disseminated peritoneal disease,” *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 10, no. 23, pp. 7834–7841, Dec. 2004.
- [153] D. E. Milenic *et al.*, “Multimodality therapy: potentiation of high linear energy transfer radiation with paclitaxel for the treatment of disseminated peritoneal disease,” *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 14, no. 16, pp. 5108–5115, Aug. 2008.
- [154] S. Hassfjell and M. W. Brechbiel, “The development of the alpha-particle emitting radionuclides ^{212}Bi and ^{213}Bi , and their decay chain related radionuclides, for therapeutic applications,” *Chem. Rev.*, vol. 101, no. 7, pp. 2019–2036, Jul. 2001.
- [155] M. R. McDevitt *et al.*, “Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides,” *Eur. J. Nucl. Med.*, vol. 25, no. 9, pp. 1341–1351, Sep. 1998.
- [156] M. R. McDevitt, R. D. Finn, G. Sgouros, D. Ma, and D. A. Scheinberg, “An $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ generator system for therapeutic clinical applications: construction and operation,” *Appl. Radiat. Isot.*, vol. 50, no. 5, pp. 895–904, mai 1999.
- [157] F. M. Kaspersen, E. Bos, A. V. Doornmalen, M. W. Geerlings, C. Apostolidis, and R. Molinet, “Cytotoxicity of ^{213}Bi - and ^{225}Ac -immunoconjugates,” *Nucl. Med. Commun.*, vol. 16, no. 6, pp. 468–476, Jun. 1995.
- [158] D. S. Wilbur, “Potential use of alpha-emitting radionuclides in the treatment of cancer,” *Antib. Immunoconjug. Radiopharm.*, vol. 4, no. 1, pp. 85–97, 1991.
- [159] L. Morandeau *et al.*, “Synthesis of new bivalent peptides for applications in the Affinity Enhancement System,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 16, no. 1, pp. 184–193, Feb. 2005.
- [160] P. Hoskin *et al.*, “Efficacy and safety of radium-223 dichloride in patients with castration-resistant prostate cancer and symptomatic bone metastases, with or without previous docetaxel use: a prespecified subgroup analysis from the randomised, double-blind, phase 3 ALSYMPCA trial,” *Lancet Oncol.*, vol. 15, no. 12, pp. 1397–1406, Nov. 2014.
- [161] M. Moreau, “Radiolabeling of biological vectors by polyazamacrocyclic complexes,” Theses, Université de Bourgogne, 2012.
- [162] R. D. Alvarez *et al.*, “Intraperitoneal radioimmunotherapy of ovarian cancer with ^{177}Lu -CC49: a phase I/II study,” *Gynecol. Oncol.*, vol. 65, no. 1, pp. 94–101, Apr. 1997.
- [163] J. Sharifi, L. A. Khawli, J. L. Hornick, and A. L. Epstein, “Improving monoclonal antibody pharmacokinetics via chemical modification,” *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 42, no. 4, p. 242, 1998.
- [164] O. A. Gansow, “Newer approaches to the radiolabeling of monoclonal antibodies by use of metal chelates,” *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B*, vol. 18, no. 4, pp. 369–381, 1991.
- [165] M. K. Moi, C. F. Meares, and S. J. DeNardo, “The peptide way to macrocyclic bifunctional chelating agents: synthesis of 2-(p-nitrobenzyl)-1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-N, N', N'', N'''-tetraacetic acid and study of its yttrium (III) complex,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 110, no. 18, pp. 6266–6267, 1988.
- [166] K. Takenouchi, K. Watanabe, Y. Kato, T. Koike, and E. Kimura, “Novel bifunctional macrocyclic chelating agents appended with a pendant-type carboxymethylamino ligand and nitrobenzyl group and stability of the ^{88}Y complexes,” *J. Org. Chem.*, vol. 58, no. 7, pp. 1955–1958, 1993.
- [167] G. Ruble, C. Wu, R. A. Squire, O. A. Gansow, and M. Strand, “The use of ^{212}Pb -labeled monoclonal antibody in the treatment of murine erythroleukemia,” *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 34, no. 3, pp. 609–616, 1996.

- [168] J. B. Stimmel and F. C. Kull, "Samarium-153 and lutetium-177 chelation properties of selected macrocyclic and acyclic ligands," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 25, no. 2, pp. 117–125, 1998.
- [169] L. L. Chappell, E. Dadachova, D. E. Milenic, K. Garmestani, C. Wu, and M. W. Brechbiel, "Synthesis, characterization, and evaluation of a novel bifunctional chelating agent for the lead isotopes ^{203}Pb and ^{212}Pb ," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 27, no. 1, pp. 93–100, 2000.
- [170] M. W. Brechbiel and O. A. Gansow, "Synthesis of C-functionalized trans-cyclohexyldiethylenetriaminepenta-acetic acids for labelling of monoclonal antibodies with the bismuth-212 α -particle emitter," *J. Chem. Soc. [Perkin 1]*, no. 9, pp. 1173–1178, 1992.
- [171] D. E. Milenic *et al.*, "In vivo comparison of macrocyclic and acyclic ligands for radiolabeling of monoclonal antibodies with ^{177}Lu for radioimmunotherapeutic applications," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 29, no. 4, pp. 431–442, May 2002.
- [172] J. G. Jurcic *et al.*, "Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia," *Blood*, vol. 100, no. 4, pp. 1233–1239, Aug. 2002.
- [173] M. W. Brechbiel, "Bifunctional chelates for metal nuclides," *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging Off. Publ. Ital. Assoc. Nucl. Med. AIMN Int. Assoc. Radiopharmacol. IAR Sect. Soc. Radiopharm. Chem. Biol.*, vol. 52, no. 2, pp. 166–173, Jun. 2008.
- [174] D. J. Buchsbaum *et al.*, "Targeting strategies for cancer radiotherapy," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 5, no. 10 Suppl, p. 3048s–3055s, Oct. 1999.
- [175] D. J. Buchsbaum *et al.*, "Intraperitoneal Pretarget Radioimmunotherapy with CC49 Fusion Protein," *Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 11, no. 22, pp. 8180–8185, Nov. 2005.
- [176] S. Palm *et al.*, "Therapeutic efficacy of astatine-211-labeled trastuzumab on radioresistant SKOV-3 tumors in nude mice," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 69, no. 2, pp. 572–579, Oct. 2007.
- [177] L. A. Walton, A. Yadusky, and L. Rubinstein, "Intraperitoneal radioactive phosphate in early ovarian carcinoma: an analysis of complications," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 20, no. 5, pp. 939–944, May 1991.
- [178] D. K. Armstrong *et al.*, "Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 354, no. 1, pp. 34–43, Jan. 2006.
- [179] R. F. Meredith *et al.*, "Intraperitoneal radioimmunotherapy of ovarian cancer with lutetium-177-CC49," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 37, no. 9, pp. 1491–1496, Sep. 1996.
- [180] R. D. Alvarez *et al.*, "A Phase I study of combined modality (90)Yttrium-CC49 intraperitoneal radioimmunotherapy for ovarian cancer," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 8, no. 9, pp. 2806–2811, Sep. 2002.
- [181] R. H. Verheijen *et al.*, "Phase III trial of intraperitoneal therapy with yttrium-90-labeled HMFG1 murine monoclonal antibody in patients with epithelial ovarian cancer after a surgically defined complete remission," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 24, no. 4, pp. 571–578, Feb. 2006.
- [182] H. Andersson *et al.*, "Intraperitoneal alpha-particle radioimmunotherapy of ovarian cancer patients: pharmacokinetics and dosimetry of (211)At-MX35 F(ab')₂--a phase I study," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 50, no. 7, pp. 1153–1160, Jul. 2009.
- [183] R. Loevinger, T. F. Budinger, and E. E. Watson, *MIRD primer for absorbed dose calculations*. Society of Nuclear Medicine, 1988.
- [184] W. E. Bolch, K. F. Eckerman, G. Sgouros, and S. R. Thomas, "MIRD pamphlet No. 21: a generalized schema for radiopharmaceutical dosimetry--standardization of nomenclature," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 50, no. 3, pp. 477–484, Mar. 2009.

- [185] W. S. Snyder, M. R. Ford, and G. G. Warner, "MIRD pamphlet no. 5, revised: Estimates of specific absorbed fractions for photon sources uniformly distributed in various organs of a heterogeneous phantom," *N. Y. NY Soc. Nucl. Med.*, 1978.
- [186] S. M. Goddu, *MIRD Cellular S values: Self-absorbed dose per unit cumulated activity for selected radionuclides and monoenergetic electron and alpha particle emitters incorporated into different cell compartments*. Society of Nuclear Medicine, 1997.
- [187] E. D. Yorke, L. E. Williams, A. J. Demidecki, D. B. Heidorn, P. L. Roberson, and B. W. Wessels, "Multicellular dosimetry for beta-emitting radionuclides: autoradiography, thermoluminescent dosimetry and three-dimensional dose calculations," *Med. Phys.*, vol. 20, no. 2 Pt 2, pp. 543–550, Apr. 1993.
- [188] W. E. Bolch *et al.*, "MIRD pamphlet No. 17: the dosimetry of nonuniform activity distributions--radionuclide S values at the voxel level. Medical Internal Radiation Dose Committee," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 40, no. 1, p. 11S–36S, Jan. 1999.
- [189] R. W. Howell, D. V. Rao, and K. S. Sastry, "Macroscopic dosimetry for radioimmunotherapy: nonuniform activity distributions in solid tumors," *Med. Phys.*, vol. 16, no. 1, pp. 66–74, Feb. 1989.
- [190] G. Sgouros *et al.*, "Treatment planning for internal radionuclide therapy: three-dimensional dosimetry for nonuniformly distributed radionuclides," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 31, no. 11, pp. 1884–1891, Nov. 1990.
- [191] G. Sgouros *et al.*, "Three-dimensional dosimetry for radioimmunotherapy treatment planning," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 34, no. 9, pp. 1595–1601, Sep. 1993.
- [192] S. M. Goddu, R. W. Howell, L. G. Bouchet, W. E. Bolch, and D. V. Rao, "MIRD cellular S values," *Rest. VA Soc. Nucl. Med.*, 1997.
- [193] S. M. Goddu, R. W. Howell, and D. V. Rao, "Cellular dosimetry: absorbed fractions for monoenergetic electron and alpha particle sources and S-values for radionuclides uniformly distributed in different cell compartments," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 35, no. 2, pp. 303–316, Feb. 1994.
- [194] H. H. Rossi, "Microscopic energy distribution in irradiated matter," *Radiat. Dosim.*, vol. 1, pp. 43–92, 1968.
- [195] W. C. Roesch, "Microdosimetry of internal sources," *Radiat. Res.*, vol. 70, no. 3, pp. 494–510, Jun. 1977.
- [196] T. G. Stinchcomb and J. C. Roeske, "Analysis of survival of C-18 cells after irradiation in suspension with chelated and ionic bismuth-212 using microdosimetry," *Radiat. Res.*, vol. 140, no. 1, pp. 48–54, Oct. 1994.
- [197] E. Polig, "Localized Alpha-Dosimetry for Cancer Induction Studies," in *Metals in Bone*, N. D. Priest, Ed. Springer Netherlands, 1985, pp. 269–284.
- [198] D. Dabli, "Utilisation d'un modèle microdosimétrique cinétique (MKM) pour l'interprétation d'irradiations cellulaires dans le cadre de l'hadronthérapie : Application de simulations Monte-Carlo.," phdthesis, Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2010.
- [199] T. G. Stinchcomb and J. C. Roeske, "Analytic microdosimetry for radioimmunotherapeutic alpha emitters," *Med. Phys.*, vol. 19, no. 6, pp. 1385–1393, Dec. 1992.
- [200] P. Olko and J. Booz, "Energy deposition by protons and alpha particles in spherical sites of nanometer to micrometer diameter," *Radiat. Environ. Biophys.*, vol. 29, no. 1, pp. 1–17, 1990.
- [201] A. M. Kellerer and D. Chmelevsky, "Criteria for the applicability of LET," *Radiat. Res.*, vol. 63, no. 2, pp. 226–234, Aug. 1975.

- [202] M. Tubiana, J. Dutreix, and A. Wambersie, "Radiobiology," 1986.
- [203] D. T. Goodhead, "Spatial and temporal distribution of energy," *Health Phys.*, vol. 55, no. 2, pp. 231–240, Aug. 1988.
- [204] F. Tessier and P. Marconnet, "Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice," *Sci. Sports*, vol. 10, no. 1, pp. 1–13, Jan. 1995.
- [205] V. Afonso, R. Champy, D. Mitrovic, P. Collin, and A. Lomri, "Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases," *Joint Bone Spine*, vol. 74, no. 4, pp. 324–329, 2007.
- [206] Y. Wang, J. Fang, S. S. Leonard, and K. M. K. Rao, "Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 36, no. 11, pp. 1434–1443, 2004.
- [207] M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur, "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 160, no. 1, pp. 1–40, Mar. 2006.
- [208] S. J. Stohs and D. Bagchi, "Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 18, no. 2, pp. 321–336, 1995.
- [209] Wilson, A and Salamatian, L, "Les radicaux libres : Une question d'équilibre." .
- [210] V. C. Culotta, "Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism," *Curr. Top. Cell. Regul.*, vol. 36, pp. 117–132, 2001.
- [211] J. R. Arthur, "The glutathione peroxidases," *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, vol. 57, no. 13–14, pp. 1825–1835, Dec. 2000.
- [212] F. Labrot, D. Ribera, M. S. Denis, and J. F. Narbonne, "In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species," *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.*, vol. 1, no. 1, pp. 21–28, 1996.
- [213] S. J. K. Jensen, "Oxidative stress and free radicals," *J. Mol. Struct. THEOCHEM*, vol. 666–667, pp. 387–392, décembre 2003.
- [214] S. Barillet, "Toxicocinétique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zèbre (*Danio rerio*)," Université de Metz, 2007.
- [215] M. Frankenberg-Schwager, "Induction, repair and biological relevance of radiation-induced DNA lesions in eukaryotic cells," *Radiat. Environ. Biophys.*, vol. 29, no. 4, pp. 273–292, 1990.
- [216] A. Chetoui, I. Despiney, L. Guiraud, L. Adoui, L. Sabatier, and B. Dutrillaux, "Possible role of inner-shell ionization phenomena in cell inactivation by heavy ions," *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 65, no. 5, pp. 511–522, May 1994.
- [217] J. H. Hoeijmakers, "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer," *Nature*, vol. 411, no. 6835, pp. 366–374, May 2001.
- [218] J. F. Ward, "DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells: Identities, Mechanisms of Formation, and Reparability," in *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, vol. 35, W. E. C. and K. Moldave, Ed. Academic Press, 1988, pp. 95–125.
- [219] A. Joubert and N. Foray, "Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human cells: history, progress and controversies," *New Res. DNA Repair*, 2006.
- [220] J. Lallemand, "Radiobiologie, radiothérapie et radioprotection. Bases fondamentales," *Environ. Risques Santé*, vol. 8, no. 1, pp. 77–78, 2009.
- [221] J. Cadet, T. Douki, D. Gasparutto, and J.-L. Ravanat, "Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features," *Mutat. Res.*, vol. 531, no. 1–2, pp. 5–23, Oct. 2003.

- [222] J. Cadet, M. Berger, T. Douki, and J. L. Ravanat, "Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance," *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, vol. 131, pp. 1–87, 1997.
- [223] C. von Sonntag, *The chemical basis of radiation biology*. Taylor & Francis London, 1987.
- [224] D. T. Goodhead, "Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA," *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 65, no. 1, pp. 7–17, Jan. 1994.
- [225] H. Nikjoo, P. O'Neill, W. E. Wilson, and D. T. Goodhead, "Computational approach for determining the spectrum of DNA damage induced by ionizing radiation," *Radiat. Res.*, vol. 156, no. 5 Pt 2, pp. 577–583, Nov. 2001.
- [226] D. Averbeck, "[Mechanisms of repair and radiation-induced mutagenesis in higher eukaryotes]," *Cancer Radiothérapie J. Société Fr. Radiothérapie Oncol.*, vol. 4, no. 5, pp. 335–354, Oct. 2000.
- [227] T. Alper, "EFFECTS ON IRRADIATED MICRO-ORGANISMS OF GROWTH IN THE PRESENCE OF ACRIFLAVINE," *Nature*, vol. 200, pp. 534–536, Nov. 1963.
- [228] A. Haimovitz-Friedman *et al.*, "Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis," *J. Exp. Med.*, vol. 180, no. 2, pp. 525–535, Aug. 1994.
- [229] C. Bionda *et al.*, "Differential regulation of cell death in head and neck cell carcinoma through alteration of cholesterol levels in lipid rafts microdomains," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 75, no. 3, pp. 761–772, Feb. 2008.
- [230] D. Ardail *et al.*, "Diversity and complexity of ceramide generation after exposure of jurkat leukemia cells to irradiation," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 73, no. 4, pp. 1211–1218, Mar. 2009.
- [231] P. Santana *et al.*, "Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis," *Cell*, vol. 86, no. 2, pp. 189–199, Jul. 1996.
- [232] R. K. Schmidt-Ullrich, P. Dent, S. Grant, R. B. Mikkelsen, and K. Valerie, "Signal transduction and cellular radiation responses," *Radiat. Res.*, vol. 153, no. 3, pp. 245–257, Mar. 2000.
- [233] J. B. Little, "Delayed initiation of DNA synthesis in irradiated human diploid cells," *Nature*, vol. 218, no. 5146, pp. 1064–1065, Jun. 1968.
- [234] D. M. Gadbois *et al.*, "Alterations in the progression of cells through the cell cycle after exposure to alpha particles or gamma rays," *Radiat. Res.*, vol. 146, no. 4, pp. 414–424, Oct. 1996.
- [235] A. G. Paulovich, D. P. Toczyski, and L. H. Hartwell, "When checkpoints fail," *Cell*, vol. 88, no. 3, pp. 315–321, Feb. 1997.
- [236] L. H. Hartwell and T. A. Weinert, "Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events," *Science*, vol. 246, no. 4930, pp. 629–634, Nov. 1989.
- [237] S. J. Elledge, "Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis," *Science*, vol. 274, no. 5293, pp. 1664–1672, Dec. 1996.
- [238] A. W. Murray, "The genetics of cell cycle checkpoints," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 5, no. 1, pp. 5–11, Feb. 1995.
- [239] S. A. Amundson, T. G. Myers, and A. J. Fornace, "Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress," *Oncogene*, vol. 17, no. 25, pp. 3287–3299, Dec. 1998.
- [240] R. V. Sionov and Y. Haupt, "The cellular response to p53: the decision between life and death," *Oncogene*, vol. 18, no. 45, pp. 6145–6157, Nov. 1999.
- [241] C. E. Canman, T. M. Gilmer, S. B. Coutts, and M. B. Kastan, "Growth factor modulation of p53-mediated growth arrest versus apoptosis," *Genes Dev.*, vol. 9, no. 5, pp. 600–611, Mar. 1995.

- [242] S. Bates and K. H. Vousden, "Mechanisms of p53-mediated apoptosis," *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, vol. 55, no. 1, pp. 28–37, Jan. 1999.
- [243] J. Bartek and J. Lukas, "Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer," *Cancer Cell*, vol. 3, no. 5, pp. 421–429, May 2003.
- [244] K. K. Khanna and S. P. Jackson, "DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection," *Nat. Genet.*, vol. 27, no. 3, pp. 247–254, Mar. 2001.
- [245] O. Fernandez-Capetillo, A. Lee, M. Nussenzweig, and A. Nussenzweig, "H2AX: the histone guardian of the genome," *DNA Repair*, vol. 3, no. 8–9, pp. 959–967, Sep. 2004.
- [246] E. P. Rogakou, C. Boon, C. Redon, and W. M. Bonner, "Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo," *J. Cell Biol.*, vol. 146, no. 5, pp. 905–916, Sep. 1999.
- [247] E. P. Rogakou, D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova, and W. M. Bonner, "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 10, pp. 5858–5868, Mar. 1998.
- [248] R. T. Abraham, "Checkpoint signalling: focusing on 53BP1," *Nat. Cell Biol.*, vol. 4, no. 12, pp. E277–279, Dec. 2002.
- [249] L. B. Schultz, N. H. Chehab, A. Malikzay, and T. D. Halazonetis, "p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks," *J. Cell Biol.*, vol. 151, no. 7, pp. 1381–1390, Dec. 2000.
- [250] I. M. Ward, K. Minn, K. G. Jorda, and J. Chen, "Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 22, pp. 19579–19582, May 2003.
- [251] M. O'Driscoll, V. L. Ruiz-Perez, C. G. Woods, P. A. Jeggo, and J. A. Goodship, "A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome," *Nat. Genet.*, vol. 33, no. 4, pp. 497–501, Apr. 2003.
- [252] J. Smith, L. M. Tho, N. Xu, and D. A. Gillespie, "The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer," *Adv. Cancer Res.*, vol. 108, pp. 73–112, 2010.
- [253] R. L. Flynn and L. Zou, "ATR: a master conductor of cellular responses to DNA replication stress," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 36, no. 3, pp. 133–140, Mar. 2011.
- [254] J. Zhang *et al.*, "Prevalence and functional analysis of sequence variants in the ATR checkpoint mediator Claspin," *Mol. Cancer Res. MCR*, vol. 7, no. 9, pp. 1510–1516, Sep. 2009.
- [255] J. N. Sarkaria *et al.*, "Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine," *Cancer Res.*, vol. 59, no. 17, pp. 4375–4382, Sep. 1999.
- [256] W. S. el-Deiry *et al.*, "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression," *Cell*, vol. 75, no. 4, pp. 817–825, Nov. 1993.
- [257] G. W. Demers, S. A. Foster, C. L. Halbert, and D. A. Galloway, "Growth arrest by induction of p53 in DNA damaged keratinocytes is bypassed by human papillomavirus 16 E7," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 10, pp. 4382–4386, May 1994.
- [258] D. Rousseau, D. Cannella, J. Boulaire, P. Fitzgerald, A. Fotedar, and R. Fotedar, "Growth inhibition by CDK-cyclin and PCNA binding domains of p21 occurs by distinct mechanisms and is regulated by ubiquitin-proteasome pathway," *Oncogene*, vol. 18, no. 30, pp. 4313–4325, Jul. 1999.
- [259] E. V. Broude *et al.*, "p21(Waf1/Cip1/Sdi1) mediates retinoblastoma protein degradation," *Oncogene*, vol. 26, no. 48, pp. 6954–6958, Oct. 2007.
- [260] F. Bunz *et al.*, "Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage," *Science*, vol. 282, no. 5393, pp. 1497–1501, Nov. 1998.

- [261] L. D. Gillis, A. M. Leidal, R. Hill, and P. W. K. Lee, "p21Cip1/WAF1 mediates cyclin B1 degradation in response to DNA damage," *Cell Cycle Georget. Tex.*, vol. 8, no. 2, pp. 253–256, Jan. 2009.
- [262] N. Saleh-Gohari and T. Helleday, "Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells," *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. 12, pp. 3683–3688, 2004.
- [263] D. D'Amours and S. P. Jackson, "The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 3, no. 5, pp. 317–327, May 2002.
- [264] E. Van Dyck, A. Z. Stasiak, A. Stasiak, and S. C. West, "Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein," *Nature*, vol. 398, no. 6729, pp. 728–731, Apr. 1999.
- [265] L. Pellegrini *et al.*, "Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex," *Nature*, vol. 420, no. 6913, pp. 287–293, Nov. 2002.
- [266] T. L. R. Tan, R. Kanaar, and C. Wyman, "Rad54, a Jack of all trades in homologous recombination," *DNA Repair*, vol. 2, no. 7, pp. 787–794, Jul. 2003.
- [267] M. Oğrünç and A. Sancar, "Identification and characterization of human MUS81-MMS4 structure-specific endonuclease," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 24, pp. 21715–21720, Jun. 2003.
- [268] C. Boboila, F. W. Alt, and B. Schwer, "Classical and alternative end-joining pathways for repair of lymphocyte-specific and general DNA double-strand breaks," *Adv. Immunol.*, vol. 116, pp. 1–49, 2012.
- [269] E. Mladenov and G. Iliakis, "Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways," *Mutat. Res.*, vol. 711, no. 1–2, pp. 61–72, Jun. 2011.
- [270] C. Poinsignon *et al.*, "Phosphorylation of Artemis following irradiation-induced DNA damage," *Eur. J. Immunol.*, vol. 34, no. 11, pp. 3146–3155, Nov. 2004.
- [271] J. Wang, J. M. Pluth, P. K. Cooper, M. J. Cowan, D. J. Chen, and S. M. Yannoni, "Artemis deficiency confers a DNA double-strand break repair defect and Artemis phosphorylation status is altered by DNA damage and cell cycle progression," *DNA Repair*, vol. 4, no. 5, pp. 556–570, May 2005.
- [272] H. Wang, Z. C. Zeng, A. R. Perrault, X. Cheng, W. Qin, and G. Iliakis, "Genetic evidence for the involvement of DNA ligase IV in the DNA-PK-dependent pathway of non-homologous end joining in mammalian cells," *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, no. 8, pp. 1653–1660, Apr. 2001.
- [273] P. Ahnesorg, P. Smith, and S. P. Jackson, "XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining," *Cell*, vol. 124, no. 2, pp. 301–313, Jan. 2006.
- [274] J. Jiricny and M. Nyström-Lahti, "Mismatch repair defects in cancer," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 10, no. 2, pp. 157–161, Apr. 2000.
- [275] L. A. Aaltonen *et al.*, "Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer," *Science*, vol. 260, no. 5109, pp. 812–816, May 1993.
- [276] K. E. Buckton and H. J. Evans, "Methods for the analysis of human chromosome aberrations," 1973.
- [277] P. Haefliger, N. Agorastos, A. Renard, G. Giambonini-Brugnoli, C. Marty, and R. Alberto, "Cell uptake and radiotoxicity studies of an nuclear localization signal peptide-intercalator conjugate labeled with [99mTc(CO)3]+," *Bioconjug. Chem.*, vol. 16, no. 3, pp. 582–587, Jun. 2005.

- [278] W. Al-Achkar, L. Sabatier, and B. Dutrillaux, "Transmission of radiation-induced rearrangements through cell divisions," *Mutat. Res.*, vol. 198, no. 1, pp. 191–198, Mar. 1988.
- [279] S. V. Lennon, S. J. Martin, and T. G. Cotter, "Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli," *Cell Prolif.*, vol. 24, no. 2, pp. 203–214, Mar. 1991.
- [280] A. E. Meijer, U. S. Kronqvist, R. Lewensohn, and M. Harms-Ringdahl, "RBE for the induction of apoptosis in human peripheral lymphocytes exposed in vitro to high-LET radiation generated by accelerated nitrogen ions," *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 73, no. 2, pp. 169–177, Feb. 1998.
- [281] I. R. Radford, T. K. Murphy, J. M. Radley, and S. L. Ellis, "Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part II. Apoptotic death is shown by all lines examined," *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 65, no. 2, pp. 217–227, Feb. 1994.
- [282] S. Basu and R. Kolesnick, "Stress signals for apoptosis: ceramide and c-Jun kinase," *Oncogene*, vol. 17, no. 25, pp. 3277–3285, Dec. 1998.
- [283] S. Baatout, H. Derradji, O. Petitfour, H. von Suchodoletz, and M. Mergeay, "[Mechanisms of radio-induced apoptosis]," *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 80, no. 7, pp. 629–637, Jul. 2002.
- [284] T. Levade, J.-P. Jaffrézou, N. Andrieu, and G. Laurent, "La voie sphingomyéline-céramide dans la réponse cellulaire aux effecteurs anti-tumoraux," 1996.
- [285] C. Mothersill and C. Seymour, "Radiation-induced bystander effects: past history and future directions," *Radiat. Res.*, vol. 155, no. 6, pp. 759–767, Jun. 2001.
- [286] W. F. Morgan, "Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vitro," *Radiat. Res.*, vol. 159, no. 5, pp. 567–580, May 2003.
- [287] K. M. Prise and J. M. O'Sullivan, "Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, no. 5, pp. 351–360, May 2009.
- [288] H. Nagasawa and J. B. Little, "Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles," *Cancer Res.*, vol. 52, no. 22, pp. 6394–6396, Nov. 1992.
- [289] C. Mothersill and C. Seymour, "Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells," *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 71, no. 4, pp. 421–427, Apr. 1997.
- [290] B. E. Lehnert, E. H. Goodwin, and A. Deshpande, "Extracellular factor(s) following exposure to alpha particles can cause sister chromatid exchanges in normal human cells," *Cancer Res.*, vol. 57, no. 11, pp. 2164–2171, Jun. 1997.
- [291] K. M. Prise, O. V. Belyakov, M. Folkard, and B. D. Michael, "Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam," *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 74, no. 6, pp. 793–798, Dec. 1998.
- [292] E. I. Azzam, S. M. de Toledo, T. Gooding, and J. B. Little, "Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles," *Radiat. Res.*, vol. 150, no. 5, pp. 497–504, Nov. 1998.
- [293] J. B. Little, "Lauriston S. Taylor lecture: nontargeted effects of radiation: implications for low-dose exposures," *Health Phys.*, vol. 91, no. 5, pp. 416–426, Nov. 2006.
- [294] J. Rzeszowska-Wolny, R. Herok, M. Widel, and R. Hancock, "X-irradiation and bystander effects induce similar changes of transcript profiles in most functional pathways in human melanoma cells," *DNA Repair*, vol. 8, no. 6, pp. 732–738, 2009.
- [295] J. M. Kaminski, E. Shinohara, J. B. Summers, K. J. Niermann, A. Morimoto, and J. Brousal, "The controversial abscopal effect," *Cancer Treat. Rev.*, vol. 31, no. 3, pp. 159–172, May 2005.

- [296] O. V. Belyakov, A. M. Malcolmson, M. Folkard, K. M. Prise, and B. D. Michael, "Direct evidence for a bystander effect of ionizing radiation in primary human fibroblasts," *Br. J. Cancer*, vol. 84, no. 5, pp. 674–679, Mar. 2001.
- [297] M. M. Shareef *et al.*, "Role of tumor necrosis factor-alpha and TRAIL in high-dose radiation-induced bystander signaling in lung adenocarcinoma," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 24, pp. 11811–11820, Dec. 2007.
- [298] G. Schettino, M. Folkard, K. M. Prise, B. Vojnovic, K. D. Held, and B. D. Michael, "Low-dose studies of bystander cell killing with targeted soft X rays," *Radiat. Res.*, vol. 160, no. 5, pp. 505–511, Nov. 2003.
- [299] E. I. Azzam, S. M. de Toledo, and J. B. Little, "Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha -particle irradiated to nonirradiated cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 2, pp. 473–478, Jan. 2001.
- [300] M. B. Sowa Resat and W. F. Morgan, "Radiation-induced genomic instability: a role for secreted soluble factors in communicating the radiation response to non-irradiated cells," *J. Cell. Biochem.*, vol. 92, no. 5, pp. 1013–1019, Aug. 2004.
- [301] H. Zhou, M. Suzuki, C. R. Geard, and T. K. Hei, "Effects of irradiated medium with or without cells on bystander cell responses," *Mutat. Res.*, vol. 499, no. 2, pp. 135–141, Feb. 2002.
- [302] B. I. Gerashchenko and R. W. Howell, "Cell proximity is a prerequisite for the proliferative response of bystander cells co-cultured with cells irradiated with gamma-rays," *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.*, vol. 56, no. 2, pp. 71–80, Dec. 2003.
- [303] M. Folkard *et al.*, "A charged-particle microbeam: I. Development of an experimental system for targeting cells individually with counted particles," *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 72, no. 4, pp. 375–385, Oct. 1997.
- [304] G. Randers-Pehrson, C. R. Geard, G. Johnson, C. D. Elliston, and D. J. Brenner, "The Columbia University single-ion microbeam," *Radiat. Res.*, vol. 156, no. 2, pp. 210–214, Aug. 2001.
- [305] M. Mancuso *et al.*, "Oncogenic bystander radiation effects in Patched heterozygous mouse cerebellum," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 34, pp. 12445–12450, Aug. 2008.
- [306] S. Nagar, L. E. Smith, and W. F. Morgan, "Characterization of a novel epigenetic effect of ionizing radiation: the death-inducing effect," *Cancer Res.*, vol. 63, no. 2, pp. 324–328, Jan. 2003.
- [307] C. Mothersill *et al.*, "Individual variation in the production of a 'bystander signal' following irradiation of primary cultures of normal human urothelium," *Carcinogenesis*, vol. 22, no. 9, pp. 1465–1471, Sep. 2001.
- [308] J.-C. Hervé, N. Bourmeyster, D. Sarrouilhe, and H. S. Duffy, "Gap junctional complexes: from partners to functions," *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 94, no. 1–2, pp. 29–65, Jun. 2007.
- [309] M. Oyamada, Y. Oyamada, and T. Takamatsu, "Regulation of connexin expression," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1719, no. 1–2, pp. 6–23, Dec. 2005.
- [310] H. Zhou *et al.*, "Radiation risk to low fluences of alpha particles may be greater than we thought," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 25, pp. 14410–14415, Dec. 2001.
- [311] E. I. Azzam, S. M. de Toledo, and J. B. Little, "Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from α -particle irradiated to nonirradiated cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 2, pp. 473–478, Jan. 2001.
- [312] J. E. Trosko and R. J. Ruch, "Cell-cell communication in carcinogenesis," *Front. Biosci. J. Virtual Libr.*, vol. 3, pp. d208-236, Feb. 1998.

- [313] I. Emerit, "Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 16, no. 1, pp. 99–109, Jan. 1994.
- [314] C. B. Seymour and C. Mothersill, "Delayed expression of lethal mutations and genomic instability in the progeny of human epithelial cells that survived in a bystander-killing environment," *Radiat. Oncol. Investig.*, vol. 5, no. 3, pp. 106–110, 1997.
- [315] F. M. Lyng, C. B. Seymour, and C. Mothersill, "Production of a signal by irradiated cells which leads to a response in unirradiated cells characteristic of initiation of apoptosis," *Br. J. Cancer*, vol. 83, no. 9, pp. 1223–1230, Nov. 2000.
- [316] D. A. Lewis, B. M. Mayhugh, Y. Qin, K. Trott, and M. S. Mendonca, "Production of delayed death and neoplastic transformation in CGL1 cells by radiation-induced bystander effects," *Radiat. Res.*, vol. 156, no. 3, pp. 251–258, Sep. 2001.
- [317] K. M. Prise, M. Folkard, and B. D. Michael, "Radiation-induced bystander and adaptive responses in cell and tissue models," *Dose-Response Publ. Int. Hormesis Soc.*, vol. 4, no. 4, pp. 263–276, 2006.
- [318] M. V. Sokolov, L. B. Smilenov, E. J. Hall, I. G. Panyutin, W. M. Bonner, and O. A. Sedelnikova, "Ionizing radiation induces DNA double-strand breaks in bystander primary human fibroblasts," *Oncogene*, vol. 24, no. 49, pp. 7257–7265, Nov. 2005.
- [319] O. A. Sedelnikova *et al.*, "DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three-dimensional human tissue models," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 9, pp. 4295–4302, May 2007.
- [320] L. Tartier, S. Gilchrist, S. Burdak-Rothkamm, M. Folkard, and K. M. Prise, "Cytoplasmic irradiation induces mitochondrial-dependent 53BP1 protein relocalization in irradiated and bystander cells," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 12, pp. 5872–5879, Jun. 2007.
- [321] H. Nagasawa, A. Cremesti, R. Kolesnick, Z. Fuks, and J. B. Little, "Involvement of membrane signaling in the bystander effect in irradiated cells," *Cancer Res.*, vol. 62, no. 9, pp. 2531–2534, May 2002.
- [322] T. Harada, G. Kashino, K. Suzuki, N. Matsuda, S. Kodama, and M. Watanabe, "Different involvement of radical species in irradiated and bystander cells," *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 84, no. 10, pp. 809–814, Oct. 2008.
- [323] I. Koturbash *et al.*, "Irradiation induces DNA damage and modulates epigenetic effectors in distant bystander tissue in vivo," *Oncogene*, vol. 25, no. 31, pp. 4267–4275, Jul. 2006.
- [324] I. Koturbash *et al.*, "Epigenetic dysregulation underlies radiation-induced transgenerational genome instability in vivo," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 66, no. 2, pp. 327–330, Oct. 2006.
- [325] C. Shao, M. Folkard, and K. M. Prise, "Role of TGF-beta1 and nitric oxide in the bystander response of irradiated glioma cells," *Oncogene*, vol. 27, no. 4, pp. 434–440, Jan. 2008.
- [326] P. K. Narayanan, E. H. Goodwin, and B. E. Lehnert, "Alpha particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells," *Cancer Res.*, vol. 57, no. 18, pp. 3963–3971, Sep. 1997.
- [327] K. Müller and V. Meineke, "Radiation-induced alterations in cytokine production by skin cells," *Exp. Hematol.*, vol. 35, no. 4 Suppl 1, pp. 96–104, Apr. 2007.
- [328] H. P. Rodemann and M. A. Blaese, "Responses of normal cells to ionizing radiation," *Semin. Radiat. Oncol.*, vol. 17, no. 2, pp. 81–88, Apr. 2007.
- [329] C. Bubici, S. Papa, K. Dean, and G. Franzoso, "Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: molecular basis and biological significance," *Oncogene*, vol. 25, no. 51, pp. 6731–6748, Oct. 2006.

- [330] D. Han, M. D. Ybanez, S. Ahmadi, K. Yeh, and N. Kaplowitz, "Redox regulation of tumor necrosis factor signaling," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 11, no. 9, pp. 2245–2263, Sep. 2009.
- [331] R.-M. Liu and K. A. Gaston Pravia, "Oxidative stress and glutathione in TGF-beta-mediated fibrogenesis," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 48, no. 1, pp. 1–15, Jan. 2010.
- [332] W. Zhao, W. Xie, Q. Xiao, D. R. Beers, and S. H. Appel, "Protective effects of an anti-inflammatory cytokine, interleukin-4, on motoneuron toxicity induced by activated microglia," *J. Neurochem.*, vol. 99, no. 4, pp. 1176–1187, Nov. 2006.
- [333] L. Qian, J. S. Hong, and P. M. Flood, "Role of microglia in inflammation-mediated degeneration of dopaminergic neurons: neuroprotective effect of interleukin 10," *J. Neural Transm. Suppl.*, no. 70, pp. 367–371, 2006.
- [334] D. E. Clapham, "Intracellular calcium. Replenishing the stores," *Nature*, vol. 375, no. 6533, pp. 634–635, Jun. 1995.
- [335] F. L. Bygrave and H. R. Roberts, "Regulation of cellular calcium through signaling cross-talk involves an intricate interplay between the actions of receptors, G-proteins, and second messengers," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 9, no. 13, pp. 1297–1303, Oct. 1995.
- [336] F. M. Lyng, P. Maguire, B. McClean, C. Seymour, and C. Mothersill, "The involvement of calcium and MAP kinase signaling pathways in the production of radiation-induced bystander effects," *Radiat. Res.*, vol. 165, no. 4, pp. 400–409, Apr. 2006.
- [337] F. M. Lyng *et al.*, "Apoptosis is initiated in human keratinocytes exposed to signalling factors from microbeam irradiated cells," *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 82, no. 6, pp. 393–399, Jun. 2006.
- [338] C. Mothersill, R. J. Seymour, and C. B. Seymour, "Bystander effects in repair-deficient cell lines," *Radiat. Res.*, vol. 161, no. 3, pp. 256–263, Mar. 2004.
- [339] C. Shao, F. M. Lyng, M. Folkard, and K. M. Prise, "Calcium fluxes modulate the radiation-induced bystander responses in targeted glioma and fibroblast cells," *Radiat. Res.*, vol. 166, no. 3, pp. 479–487, Sep. 2006.
- [340] P. Dent, A. Yacoub, P. B. Fisher, M. P. Hagan, and S. Grant, "MAPK pathways in radiation responses," *Oncogene*, vol. 22, no. 37, pp. 5885–5896, Sep. 2003.
- [341] E. I. Azzam, S. M. De Toledo, D. R. Spitz, and J. B. Little, "Oxidative metabolism modulates signal transduction and micronucleus formation in bystander cells from alpha-particle-irradiated normal human fibroblast cultures," *Cancer Res.*, vol. 62, no. 19, pp. 5436–5442, Oct. 2002.
- [342] M. Hagan, A. Yacoub, and P. Dent, "Ionizing radiation causes a dose-dependent release of transforming growth factor alpha in vitro from irradiated xenografts and during palliative treatment of hormone-refractory prostate carcinoma," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 10, no. 17, pp. 5724–5731, Sep. 2004.
- [343] J. E. J. Murphy, S. Nugent, C. Seymour, and C. Mothersill, "Mitochondrial DNA point mutations and a novel deletion induced by direct low-LET radiation and by medium from irradiated cells," *Mutat. Res.*, vol. 585, no. 1–2, pp. 127–136, Aug. 2005.
- [344] H. Zhou *et al.*, "Mechanism of radiation-induced bystander effect: role of the cyclooxygenase-2 signaling pathway," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 41, pp. 14641–14646, Oct. 2005.
- [345] S. Burdak-Rothkamm, S. C. Short, M. Folkard, K. Rothkamm, and K. M. Prise, "ATR-dependent radiation-induced gamma H2AX foci in bystander primary human astrocytes and glioma cells," *Oncogene*, vol. 26, no. 7, pp. 993–1002, Feb. 2007.

- [346] R. Iyer, B. E. Lehnert, and R. Svensson, "Factors underlying the cell growth-related bystander responses to alpha particles," *Cancer Res.*, vol. 60, no. 5, pp. 1290–1298, Mar. 2000.
- [347] D. Scheel-Toellner *et al.*, "Reactive oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signaling," *Blood*, vol. 104, no. 8, pp. 2557–2564, Oct. 2004.
- [348] C. Shao, M. Folkard, B. D. Michael, and K. M. Prise, "Targeted cytoplasmic irradiation induces bystander responses," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 37, pp. 13495–13500, Sep. 2004.
- [349] A. R. Cuddihy and R. G. Bristow, "The p53 protein family and radiation sensitivity: Yes or no?," *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 23, no. 3–4, pp. 237–257, Dec. 2004.
- [350] E. I. Azzam, S. M. de Toledo, A. J. Waker, and J. B. Little, "High and low fluences of alpha-particles induce a G1 checkpoint in human diploid fibroblasts," *Cancer Res.*, vol. 60, no. 10, pp. 2623–2631, May 2000.
- [351] H. Yang, N. Asaad, and K. D. Held, "Medium-mediated intercellular communication is involved in bystander responses of X-ray-irradiated normal human fibroblasts," *Oncogene*, vol. 24, no. 12, pp. 2096–2103, Mar. 2005.
- [352] U. N. S. C. on the E. of A. Radiation, *Effects of ionizing radiation: UNSCEAR 2006 Report to the General Assembly, with scientific annexes*, vol. 2. United Nations Publications, 2009.
- [353] A. L. Brooks, J. C. Retherford, and R. O. McClellan, "Effect of $^{239}\text{PuO}_2$ particle number and size on the frequency and distribution of chromosome aberrations in the liver of the Chinese hamster," *Radiat. Res.*, vol. 59, no. 3, pp. 693–709, Sep. 1974.
- [354] A. L. Brooks, S. A. Benjamin, F. F. Hahn, D. G. Brownstein, W. C. Griffith, and R. O. McClellan, "The induction of liver tumors by ^{239}Pu citrate or $^{239}\text{PuO}_2$ particles in the Chinese hamster," *Radiat. Res.*, vol. 96, no. 1, pp. 135–151, Oct. 1983.
- [355] L. R. McKay, S. M. Shaw, and A. L. Brooks, "Metaphase chromosome aberrations in the Chinese hamster liver in vivo after either acute or fractionated ^{60}Co irradiation," *Radiat. Res.*, vol. 57, no. 1, pp. 187–194, Jan. 1974.
- [356] G. E. Watson, S. A. Lorimore, D. A. Macdonald, and E. G. Wright, "Chromosomal instability in unirradiated cells induced in vivo by a bystander effect of ionizing radiation," *Cancer Res.*, vol. 60, no. 20, pp. 5608–5611, Oct. 2000.
- [357] M. A. Khan, R. P. Hill, and J. Van Dyk, "Partial volume rat lung irradiation: an evaluation of early DNA damage," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 40, no. 2, pp. 467–476, Jan. 1998.
- [358] M. A. Khan, J. Van Dyk, I. W. T. Yeung, and R. P. Hill, "Partial volume rat lung irradiation; assessment of early DNA damage in different lung regions and effect of radical scavengers," *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.*, vol. 66, no. 1, pp. 95–102, Jan. 2003.
- [359] W. K. Collett, J. A. Watson, and N. Wald, "Abscopal and direct effects on calcium mobilization, alkaline phosphatase levels, and dentin formation following x-irradiation of either the rat incisor or the thyroid-parathyroid region," *J. Dent. Res.*, vol. 45, no. 5, pp. 1529–1538, Oct. 1966.
- [360] E. W. Hahn and S. M. Feingold, "Abscopal delay of embryonic development after prefertilization x-irradiation," *Radiat. Res.*, vol. 53, no. 2, pp. 267–272, Feb. 1973.
- [361] G. B. Moment, "Recovery and abscopal effects after inhibitory X-irradiation in earthworm regeneration," *J. Exp. Zool.*, vol. 181, no. 1, pp. 33–39, Jul. 1972.
- [362] S. A. Lorimore, P. J. Coates, G. E. Scobie, G. Milne, and E. G. Wright, "Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: a mechanism for radiation-induced bystander effects?," *Oncogene*, vol. 20, no. 48, pp. 7085–7095, Oct. 2001.

- [363] B. J. Blyth and P. J. Sykes, "Radiation-induced bystander effects: what are they, and how relevant are they to human radiation exposures?," *Radiat. Res.*, vol. 176, no. 2, pp. 139–157, Aug. 2011.
- [364] K. Camphausen *et al.*, "Radiation abscopal antitumor effect is mediated through p53," *Cancer Res.*, vol. 63, no. 8, pp. 1990–1993, Apr. 2003.
- [365] L. Y. Xue, N. J. Butler, G. M. Makrigiorgos, S. J. Adelstein, and A. I. Kassis, "Bystander effect produced by radiolabeled tumor cells in vivo," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 21, pp. 13765–13770, Oct. 2002.
- [366] O. V. Belyakov *et al.*, "Biological effects in unirradiated human tissue induced by radiation damage up to 1 mm away," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 40, pp. 14203–14208, Oct. 2005.
- [367] G. Sgouros, S. J. Knox, M. C. Joiner, W. F. Morgan, and A. I. Kassis, "MIRD continuing education: Bystander and low dose-rate effects: are these relevant to radionuclide therapy?," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 48, no. 10, pp. 1683–1691, Oct. 2007.
- [368] W. F. Morgan, "Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: II. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vivo, clastogenic factors and transgenerational effects," *Radiat. Res.*, vol. 159, no. 5, pp. 581–596, May 2003.
- [369] C. L. Limoli, E. Giedzinski, W. F. Morgan, S. G. Swarts, G. D. D. Jones, and W. Hyun, "Persistent oxidative stress in chromosomally unstable cells," *Cancer Res.*, vol. 63, no. 12, pp. 3107–3111, Jun. 2003.
- [370] J. B. Little, H. Nagasawa, T. Pfenning, and H. Vetrovs, "Radiation-induced genomic instability: delayed mutagenic and cytogenetic effects of X rays and alpha particles," *Radiat. Res.*, vol. 148, no. 4, pp. 299–307, Oct. 1997.
- [371] M. Jamali and K. R. Trott, "Persistent increase in the rates of apoptosis and dicentric chromosomes in surviving V79 cells after X-irradiation," *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 70, no. 6, pp. 705–709, Dec. 1996.
- [372] F. M. Lyng, C. B. Seymour, and C. Mothersill, "Initiation of apoptosis in cells exposed to medium from the progeny of irradiated cells: a possible mechanism for bystander-induced genomic instability?," *Radiat. Res.*, vol. 157, no. 4, pp. 365–370, Apr. 2002.
- [373] G. J. Rees and C. M. Ross, "Abscopal regression following radiotherapy for adenocarcinoma," *Br. J. Radiol.*, vol. 56, no. 661, pp. 63–66, Jan. 1983.
- [374] S. Demaria *et al.*, "Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 58, no. 3, pp. 862–870, Mar. 2004.
- [375] F. Gemignani, M. Ballardini, F. Maggiani, A. M. Rossi, A. Antonelli, and R. Barale, "Chromosome aberrations in lymphocytes and clastogenic factors in plasma detected in Belarus children 10 years after Chernobyl accident," *Mutat. Res.*, vol. 446, no. 2, pp. 245–253, Dec. 1999.
- [376] I. Emerit *et al.*, "Transferable clastogenic activity in plasma from persons exposed as salvage personnel of the Chernobyl reactor," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 120, no. 9, pp. 558–561, 1994.
- [377] G. S. Pant and N. Kamada, "Chromosome aberrations in normal leukocytes induced by the plasma of exposed individuals," *Hiroshima J. Med. Sci.*, vol. 26, no. 2–3, pp. 149–154, Sep. 1977.
- [378] B. Brans, O. Linden, F. Giammarile, J. Tennvall, and C. Punt, "Clinical applications of newer radionuclide therapies," *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990*, vol. 42, no. 8, pp. 994–1003, May 2006.

- [379] R. F. Barth, J. A. Coderre, M. G. H. Vicente, and T. E. Blue, "Boron neutron capture therapy of cancer: current status and future prospects," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 11, no. 11, pp. 3987–4002, Jun. 2005.
- [380] J. E. Trosko and C. C. Chang, "Mechanism of up-regulated gap junctional intercellular communication during chemoprevention and chemotherapy of cancer," *Mutat. Res.*, vol. 480–481, pp. 219–229, Sep. 2001.
- [381] H. Yamasaki and F. Katoh, "Novel method for selective killing of transformed rodent cells through intercellular communication, with possible therapeutic applications," *Cancer Res.*, vol. 48, no. 11, pp. 3203–3207, Jun. 1988.
- [382] M. Folkard, K. M. Prise, G. Grime, K. Kirkby, and B. Vojnovic, "The use of microbeams to investigate radiation damage in living cells," *Appl. Radiat. Isot. Data Instrum. Methods Use Agric. Ind. Med.*, vol. 67, no. 3, pp. 436–439, Mar. 2009.
- [383] M. Mancuso *et al.*, "Oncogenic radiation abscopal effects in vivo: interrogating mouse skin," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 86, no. 5, pp. 993–999, Aug. 2013.
- [384] D. J. Brenner, J. B. Little, and R. K. Sachs, "The bystander effect in radiation oncogenesis: II. A quantitative model," *Radiat. Res.*, vol. 155, no. 3, pp. 402–408, Mar. 2001.
- [385] J. Rzeszowska-Wolny, W. M. Przybyszewski, and M. Widel, "Ionizing radiation-induced bystander effects, potential targets for modulation of radiotherapy," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 625, no. 1–3, pp. 156–164, Dec. 2009.
- [386] A. L. Oei *et al.*, "Decreased intraperitoneal disease recurrence in epithelial ovarian cancer patients receiving intraperitoneal consolidation treatment with yttrium-90-labeled murine HMFG1 without improvement in overall survival," *Int. J. Cancer*, vol. 120, no. 12, pp. 2710–2714, Jun. 2007.
- [387] R. Meredith, Z. You, R. Alvarez, E. Partridge, W. Grizzle, and A. LoBuglio, "Predictors of long-term outcome from intraperitoneal radioimmunotherapy for ovarian cancer," *Cancer Biother. Radiopharm.*, vol. 27, no. 1, pp. 36–40, Feb. 2012.
- [388] F. Aarts, R. P. Bleichrodt, W. J. G. Oyen, and O. C. Boerman, "Intracavitary radioimmunotherapy to treat solid tumors," *Cancer Biother. Radiopharm.*, vol. 23, no. 1, pp. 92–107, Feb. 2008.
- [389] V. Boudousq *et al.*, "Brief intraperitoneal radioimmunotherapy of small peritoneal carcinomatosis using high activities of noninternalizing 125I-labeled monoclonal antibodies," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 51, no. 11, pp. 1748–1755, Nov. 2010.
- [390] G. Köhler, S. C. Howe, and C. Milstein, "Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines," *Eur. J. Immunol.*, vol. 6, no. 4, pp. 292–295, Apr. 1976.
- [391] E. Dadachova, L. L. Chappell, and M. W. Brechbiel, "Spectrophotometric method for determination of bifunctional macrocyclic ligands in macrocyclic ligand-protein conjugates," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 26, no. 8, pp. 977–982, Nov. 1999.
- [392] C. G. Pippin, T. A. Parker, T. J. McMurry, and M. W. Brechbiel, "Spectrophotometric method for the determination of a bifunctional DTPA ligand in DTPA-monoclonal antibody conjugates," *Bioconjug. Chem.*, vol. 3, no. 4, pp. 342–345, Aug. 1992.
- [393] K. H. Sullivan and R. P. Williams, "Use of iodo-gen and iodine-125 to label the outer membrane proteins of whole cells of *Neisseria gonorrhoeae*," *Anal. Biochem.*, vol. 120, no. 2, pp. 254–258, Mar. 1982.
- [394] T. T. Puck and P. I. Marcus, "Action of x-rays on mammalian cells," *J. Exp. Med.*, vol. 103, no. 5, pp. 653–666, May 1956.
- [395] G. Mordret, "MAP kinase kinase: A node connecting multiple pathways," *Biol. Cell*, vol. 79, no. 3, pp. 193–207, Jan. 1993.

- [396] G. L'Allemain, "Deciphering the MAP kinase pathway," *Prog. Growth Factor Res.*, vol. 5, no. 3, pp. 291–334, Jan. 1994.
- [397] V. Boudousq *et al.*, "Comparison between Internalizing Anti-HER2 mAbs and Non-Internalizing Anti-CEA mAbs in Alpha-Radioimmunotherapy of Small Volume Peritoneal Carcinomatosis Using ^{212}Pb ," *PLOS ONE*, vol. 8, no. 7, p. e69613, juil 2013.
- [398] "Geant4: A toolkit for the simulation of the passage of particles through matter." [Online]. Available: <https://geant4.web.cern.ch/geant4/>. [Accessed: 15-Aug-2016].
- [399] K. E. A. Eckerman, "Radionuclide data and decay schemes," *Rest. VA Soc. Nucl. Med.*, 2008.
- [400] G. Sgouros, "Dosimetry of internal emitters," *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.*, vol. 46 Suppl 1, p. 18S–27S, Jan. 2005.
- [401] B. Piron *et al.*, "DNA damage-centered signaling pathways are effectively activated during low dose-rate Auger radioimmunotherapy," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 41 Suppl, pp. e75-83, May 2014.
- [402] S. Paillas *et al.*, "Apoptosis and p53 are not involved in the anti-tumor efficacy of ^{125}I -labeled monoclonal antibodies targeting the cell membrane," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 40, no. 4, pp. 471–480, May 2013.
- [403] S. Paillas *et al.*, "Localized irradiation of cell membrane by Auger electrons is cytotoxic through oxidative stress-mediated non-targeted effects," *Antioxid. Redox Signal.*, May 2016.
- [404] K. G. Hofer and W. L. Hughes, "Radiotoxicity of intranuclear tritium, 125 iodine and 131 iodine," *Radiat. Res.*, vol. 47, no. 1, pp. 94–101, Jul. 1971.
- [405] E. R. DeSombre, A. Hughes, R. N. Hanson, and T. Kearney, "Therapy of estrogen receptor-positive micrometastases in the peritoneal cavity with Auger electron-emitting estrogens--theoretical and practical considerations," *Acta Oncol. Stockh. Swed.*, vol. 39, no. 6, pp. 659–666, 2000.
- [406] H. Nagasawa and J. B. Little, "Bystander effect for chromosomal aberrations induced in wild-type and repair deficient CHO cells by low fluences of alpha particles," *Mutat. Res.*, vol. 508, no. 1–2, pp. 121–129, Oct. 2002.
- [407] J. B. Little, H. Nagasawa, G. C. Li, and D. J. Chen, "Involvement of the nonhomologous end joining DNA repair pathway in the bystander effect for chromosomal aberrations," *Radiat. Res.*, vol. 159, no. 2, pp. 262–267, Feb. 2003.
- [408] H. Nagasawa *et al.*, "Role of homologous recombination in the alpha-particle-induced bystander effect for sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations," *Radiat. Res.*, vol. 164, no. 2, pp. 141–147, Aug. 2005.
- [409] M. V. Sokolov, J. S. Dickey, W. M. Bonner, and O. A. Sedelnikova, "gamma-H2AX in bystander cells: not just a radiation-triggered event, a cellular response to stress mediated by intercellular communication," *Cell Cycle Georget. Tex.*, vol. 6, no. 18, pp. 2210–2212, Sep. 2007.
- [410] B. Hu *et al.*, "The time and spatial effects of bystander response in mammalian cells induced by low dose radiation," *Carcinogenesis*, vol. 27, no. 2, pp. 245–251, Feb. 2006.
- [411] M. Konopacka and J. Rzeszowska-Wolny, "The bystander effect-induced formation of micronucleated cells is inhibited by antioxidants, but the parallel induction of apoptosis and loss of viability are not affected," *Mutat. Res.*, vol. 593, no. 1–2, pp. 32–38, Jan. 2006.
- [412] P. Dent *et al.*, "Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways," *Radiat. Res.*, vol. 159, no. 3, pp. 283–300, Mar. 2003.
- [413] M. Pribyl, C. B. Muratov, and S. Y. Shvartsman, "Long-range signal transmission in autocrine relays," *Biophys. J.*, vol. 84, no. 2 Pt 1, pp. 883–896, Feb. 2003.

- [414] N. A. Monk, "Restricted-range gradients and travelling fronts in a model of juxtacrine cell relay," *Bull. Math. Biol.*, vol. 60, no. 5, pp. 901–918, Sep. 1998.
- [415] S. Havaki, A. Kotsinas, E. Chronopoulos, D. Kletsas, A. Georgakilas, and V. G. Gorgoulis, "The role of oxidative DNA damage in radiation induced bystander effect," *Cancer Lett.*, vol. 356, no. 1, pp. 43–51, Jan. 2015.
- [416] S. J. Singer and G. L. Nicolson, "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes," *Membr. Viruses Immunopathol. Day SB Good RA Eds*, pp. 7–47, 1972.
- [417] P. Lajoie, L. D. Kojic, S. Nim, L. Li, J. W. Dennis, and I. R. Nabi, "Caveolin-1 regulation of dynamin-dependent, raft-mediated endocytosis of cholera toxin-B sub-unit occurs independently of caveolae," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 13, no. 9B, pp. 3218–3225, Sep. 2009.
- [418] E. L. Smith and E. H. Schuchman, "The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 22, no. 10, pp. 3419–3431, Oct. 2008.
- [419] Y. Zhang, X. Li, K. A. Becker, and E. Gulbins, "Ceramide-enriched membrane domains--structure and function," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1788, no. 1, pp. 178–183, Jan. 2009.
- [420] H. H. Patel, F. Murray, and P. A. Insel, "Caveolae as organizers of pharmacologically relevant signal transduction molecules," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 48, pp. 359–391, 2008.
- [421] N. Cordes *et al.*, "Human pancreatic tumor cells are sensitized to ionizing radiation by knockdown of caveolin-1," *Oncogene*, vol. 26, no. 48, pp. 6851–6862, Oct. 2007.
- [422] C. E. Chalfant, K. Kishikawa, M. C. Mumby, C. Kamibayashi, A. Bielawska, and Y. A. Hannun, "Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A. Activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 29, pp. 20313–20317, Jul. 1999.
- [423] T. K. Hei *et al.*, "Mechanism of radiation-induced bystander effects: a unifying model," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 60, no. 8, pp. 943–950, Aug. 2008.
- [424] T. K. Hei, "Cyclooxygenase-2 as a signaling molecule in radiation-induced bystander effect," *Mol. Carcinog.*, vol. 45, no. 6, pp. 455–460, Jun. 2006.
- [425] L. D. Church *et al.*, "TNFR1-induced sphingomyelinase activation modulates TCR signaling by impairing store-operated Ca²⁺ influx," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 78, no. 1, pp. 266–278, Jul. 2005.
- [426] D. G. Todd, R. B. Mikkelsen, W. K. Rorrer, K. Valerie, and R. K. Schmidt-Ullrich, "Ionizing radiation stimulates existing signal transduction pathways involving the activation of epidermal growth factor receptor and ERBB-3, and changes of intracellular calcium in A431 human squamous carcinoma cells," *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, vol. 19, no. 6, pp. 885–908, Nov. 1999.
- [427] S. Lev *et al.*, "Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions," *Nature*, vol. 376, no. 6543, pp. 737–745, Aug. 1995.
- [428] Z.-H. Wu, Y. Shi, R. S. Tibbetts, and S. Miyamoto, "Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli," *Science*, vol. 311, no. 5764, pp. 1141–1146, Feb. 2006.
- [429] V. N. Ivanov *et al.*, "Radiation-induced bystander signaling pathways in human fibroblasts: a role for interleukin-33 in the signal transmission," *Cell. Signal.*, vol. 22, no. 7, pp. 1076–1087, Jul. 2010.
- [430] H. Zhou, V. N. Ivanov, Y.-C. Lien, M. Davidson, and T. K. Hei, "Mitochondrial function and nuclear factor-kappaB-mediated signaling in radiation-induced bystander effects," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 7, pp. 2233–2240, Apr. 2008.

- [431] J.-P. Pouget, C. Lozza, E. Deshayes, V. Boudousq, and I. Navarro-Teulon, "Introduction to radiobiology of targeted radionuclide therapy," *Front. Med.*, vol. 2, p. 12, 2015.
- [432] H. Lee *et al.*, "Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors," *Cancer Cell*, vol. 15, no. 4, pp. 283–293, Apr. 2009.
- [433] S. I. Grivennikov and M. Karin, "Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer," *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 21, no. 1, pp. 11–19, Feb. 2010.
- [434] C. C. Wykoff *et al.*, "Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases," *Cancer Res.*, vol. 60, no. 24, pp. 7075–7083, Dec. 2000.
- [435] S. B. Fox *et al.*, "CITED4 inhibits hypoxia-activated transcription in cancer cells, and its cytoplasmic location in breast cancer is associated with elevated expression of tumor cell hypoxia-inducible factor 1alpha," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 17, pp. 6075–6081, Sep. 2004.
- [436] Q. Zhou *et al.*, "Reactive oxygen species regulate insulin-induced VEGF and HIF-1alpha expression through the activation of p70S6K1 in human prostate cancer cells," *Carcinogenesis*, vol. 28, no. 1, pp. 28–37, Jan. 2007.
- [437] D. Flügel, A. Görlach, C. Michiels, and T. Kietzmann, "Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1alpha and mediates its destabilization in a VHL-independent manner," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, no. 9, pp. 3253–3265, May 2007.
- [438] E. L. Bell *et al.*, "The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production," *J. Cell Biol.*, vol. 177, no. 6, pp. 1029–1036, Jun. 2007.
- [439] P. Carmeliet *et al.*, "Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis," *Nature*, vol. 394, no. 6692, pp. 485–490, Jul. 1998.
- [440] L. Holmquist-Mengelbier *et al.*, "Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype," *Cancer Cell*, vol. 10, no. 5, pp. 413–423, Nov. 2006.
- [441] A. E. Greijer and E. van der Wall, "The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis," *J. Clin. Pathol.*, vol. 57, no. 10, pp. 1009–1014, Oct. 2004.
- [442] A. L. Harris, "Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 1, pp. 38–47, Jan. 2002.
- [443] R. K. Bruick, "Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 16, pp. 9082–9087, Aug. 2000.
- [444] R. Ray *et al.*, "BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 2, pp. 1439–1448, Jan. 2000.
- [445] T. Shoshani *et al.*, "Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 22, no. 7, pp. 2283–2293, Apr. 2002.
- [446] D. E. Richard, E. Berra, E. Gothié, D. Roux, and J. Pouyssegur, "p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 46, pp. 32631–32637, Nov. 1999.
- [447] N. Sang, D. P. Stiehl, J. Bohensky, I. Leshchinsky, V. Srinivas, and J. Caro, "MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 16, pp. 14013–14019, Apr. 2003.

- [448] B. M. Emerling, L. C. Platanius, E. Black, A. R. Nebreda, R. J. Davis, and N. S. Chandel, "Mitochondrial reactive oxygen species activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for hypoxia signaling," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, no. 12, pp. 4853–4862, Jun. 2005.
- [449] H. R. Rezvani *et al.*, "Hypoxia-inducible factor-1alpha, a key factor in the keratinocyte response to UVB exposure," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 22, pp. 16413–16422, Jun. 2007.
- [450] M. Kunz *et al.*, "Activation of c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is critical for hypoxia-induced apoptosis of human malignant melanoma," *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 12, no. 3, pp. 137–145, Mar. 2001.
- [451] D. R. Flower, "The lipocalin protein family: structure and function," *Biochem. J.*, vol. 318, no. 1, pp. 1–14, 1996.
- [452] L. Kjeldsen, A. H. Johnsen, H. Sengeløv, and N. Borregaard, "Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase," *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 14, pp. 10425–10432, May 1993.
- [453] J. P. Kehrer, "Lipocalin-2: pro-or anti-apoptotic?," *Cell Biol. Toxicol.*, vol. 26, no. 2, pp. 83–89, 2010.
- [454] S. V. Torti and F. M. Torti, "Iron and cancer: more ore to be mined," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 13, no. 5, pp. 342–355, May 2013.
- [455] L. L. Dunn, Y. Suryo Rahmanto, and D. R. Richardson, "Iron uptake and metabolism in the new millennium," *Trends Cell Biol.*, vol. 17, no. 2, pp. 93–100, Feb. 2007.
- [456] L. R. Devireddy, J. G. Teodoro, F. A. Richard, and M. R. Green, "Induction of apoptosis by a secreted lipocalin that is transcriptionally regulated by IL-3 deprivation," *Science*, vol. 293, no. 5531, pp. 829–834, Aug. 2001.
- [457] G. Xu *et al.*, "Lipocalin-2 induces cardiomyocyte apoptosis by increasing intracellular iron accumulation," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 7, pp. 4808–4817, Feb. 2012.
- [458] F. Shen, Z. Hu, J. Goswami, and S. L. Gaffen, "Identification of common transcriptional regulatory elements in interleukin-17 target genes," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 34, pp. 24138–24148, Aug. 2006.
- [459] P. Zhao and J. M. Stephens, "STAT1, NF-κB and ERKs play a role in the induction of lipocalin-2 expression in adipocytes," *Mol. Metab.*, vol. 2, no. 3, pp. 161–170, 2013.
- [460] J. J. Rodvold, N. R. Mahadevan, and M. Zanetti, "Lipocalin 2 in cancer: when good immunity goes bad," *Cancer Lett.*, vol. 316, no. 2, pp. 132–138, Mar. 2012.
- [461] R. Lim *et al.*, "Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) an early-screening biomarker for ovarian cancer: NGAL is associated with epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition," *Int. J. Cancer*, vol. 120, no. 11, pp. 2426–2434, Jun. 2007.
- [462] L.-Z. Liu *et al.*, "Reactive oxygen species regulate epidermal growth factor-induced vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1alpha expression through activation of AKT and P70S6K1 in human ovarian cancer cells," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 41, no. 10, pp. 1521–1533, Nov. 2006.
- [463] N. Gao *et al.*, "Vanadate-induced expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha and vascular endothelial growth factor through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and reactive oxygen species," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 35, pp. 31963–31971, Aug. 2002.
- [464] G. M. Herring and P. W. Kent, "SOME STUDIES ON MUCOSUBSTANCES OF BOVINE CORTICAL BONE," *Biochem. J.*, vol. 89, pp. 405–414, Dec. 1963.
- [465] A. W. O'Regan, J. M. Hayden, and J. S. Berman, "Osteopontin augments CD3-mediated interferon-gamma and CD40 ligand expression by T cells, which results in IL-

- 12 production from peripheral blood mononuclear cells,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 68, no. 4, pp. 495–502, Oct. 2000.
- [466] M. Mazzali, T. Kipari, V. Ophascharoensuk, J. A. Wesson, R. Johnson, and J. Hughes, “Osteopontin--a molecule for all seasons,” *QJM Mon. J. Assoc. Physicians*, vol. 95, no. 1, pp. 3–13, Jan. 2002.
- [467] B. W. Robertson and M. A. Chellaiah, “Osteopontin induces beta-catenin signaling through activation of Akt in prostate cancer cells,” *Exp. Cell Res.*, vol. 316, no. 1, pp. 1–11, Jan. 2010.
- [468] S. R. Rittling and A. F. Chambers, “Role of osteopontin in tumour progression,” *Br. J. Cancer*, vol. 90, no. 10, pp. 1877–1881, May 2004.
- [469] K. A. Furger, R. K. Menon, A. B. Tuck, V. H. Bramwell, and A. F. Chambers, “The functional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis,” *Curr. Mol. Med.*, vol. 1, no. 5, pp. 621–632, Nov. 2001.
- [470] N. Euer *et al.*, “Identification of genes associated with metastasis of mammary carcinoma in metastatic versus non-metastatic cell lines,” *Anticancer Res.*, vol. 22, no. 2A, pp. 733–740, Apr. 2002.
- [471] D. Agrawal *et al.*, “Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 94, no. 7, pp. 513–521, Apr. 2002.
- [472] N. S. Fedarko, A. Jain, A. Karadag, M. R. Van Eman, and L. W. Fisher, “Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate, and lung cancer,” *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 7, no. 12, pp. 4060–4066, Dec. 2001.
- [473] T. Hagemann *et al.*, “Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF-kappa B and JNK,” *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 175, no. 2, pp. 1197–1205, Jul. 2005.
- [474] T. Hagemann, S. C. Robinson, R. G. Thompson, K. Charles, H. Kulbe, and F. R. Balkwill, “Ovarian cancer cell-derived migration inhibitory factor enhances tumor growth, progression, and angiogenesis,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 6, no. 7, pp. 1993–2002, Jul. 2007.
- [475] M. Krockenberger *et al.*, “Macrophage migration inhibitory factor contributes to the immune escape of ovarian cancer by down-regulating NKG2D,” *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 180, no. 11, pp. 7338–7348, Jun. 2008.
- [476] K. L. Meyer-Siegler, K. A. Iczkowski, L. Leng, R. Bucala, and P. L. Vera, “Inhibition of Macrophage Migration Inhibitory Factor or Its Receptor (CD74) Attenuates Growth and Invasion of DU-145 Prostate Cancer Cells,” *J. Immunol.*, vol. 177, no. 12, pp. 8730–8739, Dec. 2006.
- [477] J. D. Hudson, M. A. Shoaibi, R. Maestro, A. Carnero, G. J. Hannon, and D. H. Beach, “A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity,” *J. Exp. Med.*, vol. 190, no. 10, pp. 1375–1382, Nov. 1999.
- [478] R. Bucala and S. C. Donnelly, “Macrophage migration inhibitory factor: a probable link between inflammation and cancer,” *Immunity*, vol. 26, no. 3, pp. 281–285, Mar. 2007.
- [479] T. Calandra and T. Roger, “Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, no. 10, pp. 791–800, Oct. 2003.
- [480] H. Nakamae *et al.*, “Biodistributions, myelosuppression, and toxicities in mice treated with an anti-CD45 antibody labeled with the alpha-emitting radionuclides bismuth-213 or astatine-211,” *Cancer Res.*, vol. 69, no. 6, pp. 2408–2415, Mar. 2009.
- [481] J. Rotmensch, J. L. Whitlock, J. L. Schwartz, J. J. Hines, R. C. Reba, and P. V. Harper, “In vitro and in vivo studies on the development of the α -emitting radionuclide bismuth

212 for intraperitoneal use against microscopic ovarian carcinoma,” *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 176, no. 4, pp. 833–841, avril 1997.

Annexes

Liste des communications orales

1. *41st Annual Meeting of the European Radiation Research Society (September 14, 2014, Rhodes, Aegean, Greece)* S. Paillas **R. Ladjohounlou**, R. J. Mairs, A. Pichard, T. Chardès, I. Navarro-Teulon, and Jean-Pierre Pouget. *Cell membrane mediated bystander effects are involved in ^{125}I -monoclonal antibodies radioimmunotherapy.*
2. *EANM'14 - Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine (October 18 - 22, 2014 in Gothenburg/SWEDEN).* **R. Ladjohounlou**, A. Pichard, V. Boudousq, L. Bobyk, S. Paillas, M. Le Blay, M. Busson, C. Lozza, J. Torgue, I. Navarro-Teulon and Jean-Pierre Pouget. *Dose-effect relationship during alpha-RIT of small volume peritoneal carcinomatosis using ^{212}Pb -labeled mAbs*
3. *9th Symposium on Targeted Alpha Therapy (May 19 – 21, 2015 Warsaw, Poland).* **R. Ladjohounlou**, A. Pichard, V. Boudousq, N. Chouin, F. Bruchertseifer, A. Morgenstern, I. Navarro-Teulon and Jean-Pierre Pouget. *Anti-tumor efficacy of a ^{213}Bi -labeled anti-MISRII 16F12 monoclonal antibody in ovarian cancer.*
4. *EANM'15 - Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine (October 10 - 14, 2015 in Hamburg/Germany).* **R. Ladjohounlou**, A. Pichard, V. Boudousq, , Nicolas Chouin, Frank Bruchertseifer, Alfred Morgenstern I. Navarro-Teulon and Jean-Pierre Pouget. *Alpha radioimmunotherapy using ^{213}Bi -anti MISRII mAb in ovarian cancer*
5. *12^{èmes} Journées du Cancéropôle Grand Sud-Ouest (November 23 – 25, 2016 in Grande Motte France).* **R. Ladjohounlou**, A. Pichard, V. Boudousq, S. Paillas, M. Le Blay, C. Lozza, S. Marcatili, M. Bardiès, J. Torgue, I. Navarro-Teulon and Jean-Pierre Pouget. *Involvement of targeted and non-targeted effects during alpha or Auger RIT of small volume peritoneal carcinomatosis.*

Liste des Posters

1. *10^{ème} journées du Cancéropôle Grand Sud-Ouest (CGSO), (October 16 – 17, 2014 in Toulouse France).* **R. Ladjohounlou**, V. Boudousq, A. Pichard, S. Paillas, M. Le Blay, C. Lozza, F. Bruchertseifer, I. Navarro-Teulon, and J-P Pouget. *Brief Intraperitoneal Radioimmunotherapy (BIP-RIT) with ^{213}Bi for treated peritoneal carcinomatosis.*
2. *EANM'16 - Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine (October 15 - 19, 2016 in Barcelona/Spain).* **R. Ladjohounlou**, A. Pichard, V. Boudousq, N. Chouin, F. Bruchertseifer, A. Morgenstern I. Navarro-Teulon and J-P Pouget. *Assessment of therapeutic efficacy of ^{213}Bi -anti MISRII mAb in ovarian cancer.*

Liste des Publications

1. *Localized Irradiation of Cell Membrane by Auger Electrons Is Cytotoxic Through Oxidative Stress-Mediated Nontargeted Effects.* Paillas S, **Ladjohounlou R**, Lozza C,

Pichard A, Boudousq V, Jarlier M, Sevestre S, Le Blay M, Deshayes E, Sosabowski J, Chardès T, Navarro-Teulon I, Mairs RJ, Pouget JP. *Antioxid Redox Signal*. 2016 Sep 10; 25(8):467-84. doi: 10.1089/ars.2015.6309. Epub 2016 Jul 5. PMID: 27224059

2. ***Realistic multi-cellular dosimetry for ¹⁷⁷Lu-labelled antibodies: model and application.*** Marcatili S, Pichard A, Courteau A, **Ladjohounlou R**, Navarro-Teulon I, Repetto-Llamazares A, Heyerdahl H, Dahle J, Pouget JP, Bardiès M. *Phys Med Biol*. 2016 Oct 7;61(19):69356952. PMID: 27617585

3. ***Non-targeted effects participate to the therapeutic efficacy of Alpha (²¹²Pb, ²¹³Bi) particles during radioimmunotherapy of solid tumors.*** **Ladjohounlou R**, Pichard A, Boudousq V, Paillas S, Le Blay M, Bernex F, Lozza C, Marcatili S, Bardiès M, Bruchertseifer F, Morgenstern A, Torgue J, Navarro-Teulon I and Pouget JP. **En préparation**

RESUME

L'efficacité d'une radioimmunothérapie (RIT) peut impliquer la coexistence des effets ciblés et des effets dit « non ciblés ». Les effets ciblés regroupent les effets biologiques observés dans les cellules ou tissus traversés par les particules ionisantes alors que les effets non-ciblés (ou bystander) sont observés dans des cellules qui n'ont pas été irradiées mais qui sont au proche voisinage des cellules exposées. Nous avons au cours de cette étude évalué *in vitro* et *in vivo*, la contribution des effets ciblés et non ciblés dans l'efficacité obtenue lors de la RIT alpha (^{212}Pb , ^{213}Bi) et de la RIT Auger (^{125}I). Les effets ciblés ont été mesurés *in vitro* sur les cellules irradiées (cellules donneuses) alors que les effets bystander sont mesurés sur les cellules non irradiées (cellules receveuses) par une méthode de transfert de milieu. Elle consiste, à traiter les cellules receveuses dans un milieu de culture pré-incubé pendant 2h avec les cellules donneuses. Nos résultats montrent que la contribution des effets ciblés est nettement plus importante qu'en RIT alpha qu'Auger. En RIT alpha, on observe que les lésions de l'ADN (foci 53BP1 et γ -H2AX) pourraient être différenciées en lésions complexes (sites multilésés = observation de gros foci) ou simples lésions (petit foci). Par contre en RIT Auger, ce sont les effets non ciblés qui prédominent sur les effets ciblés. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des ROS montre l'implication du stress oxydatif dans ces effets non ciblés observés en RIT alpha et Auger. Ces effets non ciblés ont été observés également *in vivo* sur des souris athymiques porteuses de carcinomes péritonéaux de petites tailles ; démontrant ainsi leur contribution dans l'efficacité thérapeutique finale observée après la RIT alpha et Auger. L'ensemble de ces résultats indiquent que même si des lésions de l'ADN sont produites après irradiation, que les effets non ciblés pourraient aussi contribuer à l'efficacité thérapeutique finale observée avec les anticorps couplés aux émetteurs de particules alpha ou d'électrons Auger. Ces résultats sont particulièrement intéressants pour la thérapie ciblée car les vecteurs utilisés n'ont pas souvent accès à l'ensemble des cellules constituant la tumeur.

Mots clés : radioimmunothérapie ; anticorps monoclonaux ; émetteurs de particules alpha ; électrons Auger ; lésions de l'ADN ; stress oxydatif ; effets bystander ; dosimétrie

ABSTRACT

We investigated *in vitro* and *in vivo* the relative contribution of targeted and non-targeted effects in the therapeutic efficacy against tumors of antibodies radiolabeled with alpha particle (^{212}Pb , ^{213}Bi) or Auger electron (^{125}I) emitters. Targeted effects occurs in cells directly crossed by ionising particles while non-targeted effects are measured in cells neighbouring irradiated cells. Targeted effects were measured *in vitro* in cells exposed to antibodies radiolabeled with alpha or Auger emitters (donor cells) while non-targeted effects were investigated in recipient cells. Recipient cells consisted of cells not exposed to radiolabeled-mAbs, but grown in medium previously incubated for 2h with donor cells. We showed that the relative contribution of targeted effects *versus* non-targeted effects was higher during alpha RIT than Auger RIT. Alpha particles produced 53BP1 and gamma-H2AX foci in donor cells that could be differentiated in large, medium and small foci, while only small foci were observed in recipient cells. We assumed that large foci would correspond to locally multiply damage sites in DNA. Conversely, Auger RIT led predominantly to non-targeted effects compared with targeted effects. Use of radical scavengers showed that oxidative stress was involved in non-targeted effects. *In vivo*, we showed in athymic nude mice bearing tumor xenograft that non-targeted effects were also involved and participated to therapeutic efficacy of radiolabeled antibodies. These results indicate that although producing single DNA lesion, non-targeted effects can contribute to the therapeutic efficacy of mAbs radiolabeled with alpha particle or Auger electron emitters. These findings are particularly relevant for targeted therapy in which vectors cannot gain access to every tumor cell.

Keys words: Radioimmunotherapy (RIT); monoclonal antibodies (mAbs); alpha particles emitters; Auger electrons; DNA damage; oxidative stress; bystander effects; dosimetry