



HAL
open science

Développement de radiotraceurs pour l'imagerie phénotypique des cancers du sein métastatiques

Christopher Montemagno

► **To cite this version:**

Christopher Montemagno. Développement de radiotraceurs pour l'imagerie phénotypique des cancers du sein métastatiques. Cancer. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAS039 . tel-02409150

HAL Id: tel-02409150

<https://theses.hal.science/tel-02409150>

Submitted on 13 Dec 2019

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 DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biotechnologie, Instrumentation, Signal et imagerie pour la médecine, la biologie et l'environnement**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Christopher MONTEMAGNO

Thèse dirigée par **Catherine GHEZZI, Professeur, Université Grenoble Alpes**, et
codirigée par **Alexis BROISAT, CRCN, INSERM**

préparée au sein du **Laboratoire Radiopharmaceutiques
Biocliniques UMR INSERM 1039**
dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la santé, la
cognition et l'environnement**

Développement de radiotraceurs pour l'imagerie phénotypique des cancers du sein métastatiques

Thèse soutenue publiquement le **14 décembre 2018**,
Devant le jury composé de :

Mr Gilles PAGES

DR, Nice, Président

Mme Sylvie CHALON

DR, Tours, Rapporteur

Mr Charles DUMONTET

PU-PH, Lyon, Rapporteur

Mr Gilles KARCHER

PU-PH, Nancy, Examineur

Mr Maurizio MARIANI

MD, PhD, Advanced Accelerator Applications SA, Invité

Mr Loic DJAILEB

MD, Grenoble, Invité

Mme Catherine GHEZZI

PU, Grenoble, Directrice de thèse

Mr Alexis Broisat

CR, Grenoble, Co-directeur de thèse



Sommaire

Liste des abréviations	8
Introduction générale.....	12
Introduction bibliographique.....	16
1. Données épidémiologiques	16
1.1 Incidence, mortalité et évolution du cancer du sein.....	16
1.2 Facteurs de risque du cancer du sein.....	18
2. Le cancer du sein	20
2.1 Anatomie du sein	20
2.2 Cancer du sein.....	21
2.3 Classifications des cancers du sein	23
2.3.1 Classification histologique	23
2.3.2 Classification moléculaire	25
2.4 Facteurs pronostiques du cancer du sein.....	30
3. Dissémination métastatique	33
3.1 Principes généraux	33
3.2 Micro-environnement tumoral	35
3.3 Mécanismes moléculaires de la cascade métastatique.....	37
3.4 Profil de dissémination métastatique	48
4. Diagnostic et prise en charge thérapeutique du cancer du sein.....	52
4.1 Bilan diagnostique initial du cancer du sein	52
4.2 Prise en charge thérapeutique du cancer du sein	53
5. Hétérogénéité phénotypique tumeur primaire-métastases.....	58
5.1 Généralités.....	58
5.2 Discordance entre tumeur primaire et métastases : observations	59
5.3 Pourquoi une-t-elle discordance ?.....	61
5.3.1 Hétérogénéité intra-tumorale : sélection clonale vs modèle adaptatif	61
5.3.2 Micro-environnement et plasticité tumorale.....	64
5.3.3 Pression de sélection thérapeutique	65
5.4 Impact de la discordance tumeur primaire-métastase sur la survie des patients et la prise en charge thérapeutique.....	66

6. La médecine nucléaire pour l'approche diagnostique et thérapeutique des cancers du sein métastatiques.....	68
6.1 Anticorps et fragments d'anticorps comme vecteur.....	76
6.2 Agents disponibles pour l'imagerie phénotypique	83
6.3 Autres agents en cours de développement.....	86
Partie I : Développement d'un traceur compagnon pour la thérapie des tumeurs exprimant la mésothéline	90
1. La mésothéline.....	91
1.1 Identification et découverte de la MSLN	91
1.2 Structure de la MSLN	91
1.3 Fonction physiologique de la MSLN	93
1.4 Interaction de la MSLN avec CA125.....	94
2. Mésothéline et cancer	96
2.1 Expression de la mésothéline dans les cancers	96
2.2 Rôle de la mésothéline dans la progression tumorale	99
2.3 Régulation génétique de la MSLN dans les cellules cancéreuses.....	102
2.4 Rôle prédictif de l'expression de la MSLN sur le devenir des patients .	103
2.5 Dosage de la MSLN soluble en cancérologie.....	106
2.6 Ciblage thérapeutique de la mésothéline.....	107
2.7 Agents d'imagerie ciblant la MSLN	118
Partie expérimentale	128
Matériel et Méthodes	130
1. Etudes <i>in vitro</i>	130
1.1 Culture cellulaire	130
1.2 Détermination de l'expression de la MSLN en Western Blot	134
1.3 Mesure de la fixation des nanobodies A1 et C6 sur cellules par cytométrie en flux.....	135
1.4 Radiomarquage des nanobodies A1 et C6 au ^{99m} Tc et stabilité	136
1.5 Détermination de l'affinité de ^{99m} Tc-A1 et ^{99m} Tc-C6	138
1.6 Etude de compétition	139
2. Etudes <i>in vivo</i> - Imagerie des tumeurs greffées en sous-cutanée exprimant la MSLN.....	140
2.1 Modèle animal.....	140
2.2 Injection du radiotraceur.....	142
2.3 Imagerie corps entier et quantification de la fixation tumorale.....	142

2.4 Etudes de biodistribution	143
3. Etudes <i>in vivo</i> – Etudes de compétition	144
3.1 Modèle animal.....	144
3.2 Injection du radiotraceur.....	144
3.3 Imagerie et biodistribution.....	144
4. Etudes <i>ex vivo</i>.....	145
4.1 Analyse de l'expression de la MSLN	145
5. Analyse statistique	148
Résultats.....	150
1. Etudes <i>in vitro</i>.....	150
1.1 Viabilité cellulaire et mesure du temps de doublement.....	150
1.2 Mesure de l'expression de la MSLN en Western Blot	150
1.3 Mesure de la fixation du nanobody A1 en cytométrie de flux.....	151
1.4 Radiomarquage au ^{99m} Tc et stabilité	152
1.5 Détermination de l'affinité de ^{99m} Tc-A1 et ^{99m} Tc-C6	153
1.6 Compétition <i>in vitro</i> sur cellules.....	154
2. Evaluation du potentiel de ^{99m}Tc-A1 et ^{99m}Tc pour l'imagerie <i>in vivo</i>.....	157
1.1 Etudes de stabilité de ^{99m} Tc-A1 et ^{99m} Tc-C6	157
1.2 Evaluation de ^{99m} Tc-A1 et ^{99m} Tc-C6 <i>in vivo</i> chez la souris.....	159
1.2.1 Imagerie TEMP	159
1.2.2 Etudes de biodistribution	162
1.2.3 Corrélation TEMP/Biodistribution et détermination des rapports de fixation	163
1.3 Etudes de compétition <i>in vivo</i>	165
3. Etudes <i>ex vivo</i>.....	168
3.1 Mesure d'expression de la mésothéline.....	168
3.1.1 Western Blot	168
3.1.2 Immunohistochimie.....	170
Discussion.....	174
Partie II : Imagerie phénotypique des tumeurs du sein exprimant VCAM-1	182
1. Vascular Cell Adhesion Molecule-1	183
1.1 Identification et découverte de VCAM-1.....	183
1.2 Structure de VCAM-1	183
1.3 Rôle de VCAM-1 en physiologie.....	184

1.4	Rôle de VCAM-1 dans les pathologies inflammatoires	186
2.	VCAM-1 et progression tumorale	189
2.1	Expression sur les cellules endothéliales vasculaires	189
2.2	Expression sur les cellules endothéliales lymphatiques	191
2.3	Expression sur les cellules tumorales	192
3.	Expression de VCAM-1 en cancérologie et valeur pronostique	198
4.	Ciblage thérapeutique de l'interaction VCAM-1/VLA-4	201
5.	Intérêt de l'imagerie phénotypique des tumeurs du sein exprimant VCAM-1..	202
6.	Agents d'imagerie ciblant VCAM-1 en cancérologie	203
	Partie expérimentale	208
	Matériels et Méthodes	210
1.	Etudes <i>in vitro</i>	210
1.1	Culture cellulaire	210
1.2	Détermination de l'expression de VCAM-1.....	210
1.3	Mesure de la fixation du nanobody cAbVCAM1-5 en cytométrie en flux..	216
1.4	Radiomarquage de ^{99m} Tc-cAbVCAM1-5.....	217
1.5	Mesure de la fixation de ^{99m} Tc-cAbVCAM1-5	217
2.	Etudes <i>in vivo</i> : Modèle de tumeurs greffées en sous-cutanée	218
2.1	Modèle animal.....	218
2.2	Injection du traceur	219
2.3	Imagerie corps entier et quantification de la fixation tumorale	219
2.4	Etudes de biodistribution	220
3.	Etudes <i>in vivo</i> : Modèle de métastases pulmonaires	221
3.1	Modèle animal.....	221
3.2	Injection du traceur	221
3.3	Imagerie des poumons et quantification de la fixation tumorale	222
3.4	Etudes de biodistribution	223
4.	Etudes <i>ex vivo</i>.....	224
3.1	Quantification de la fixation de ^{99m} Tc-cAbVCAM1-5 par autoradiographie	224
3.2	Analyse de l'expression de VCAM-1.....	224
5.	Analyse statistique	225
	Résultats.....	226

1. Etudes <i>in vitro</i>	226
1.1 Mesure de l'expression de VCAM-1.....	226
1.2 Mesure de la fixation de cAbVCAM1-5 en cytométrie en flux	229
1.3 Mesure de la fixation de ^{99m} Tc-cAbVCAM1-5	230
2. Etudes <i>in vivo</i> : Modèle de tumeurs greffées en sous-cutanée	233
2.1 Suivi du volume tumoral	233
2.2 Analyse de la biodistribution de ^{99m} Tc-cAbVCAM1-5	233
2.2.1 Imagerie TEMP/TDM.....	233
2.2.2 Biodistribution par prélèvements d'organes	235
3. Etudes <i>ex vivo</i> : Modèles de tumeurs greffées en sous-cutanée	237
4. Etudes <i>in vivo</i> : Modèle de métastases pulmonaires	238
4.1 Analyse de la biodistribution de ^{99m} Tc-cAbVCAM1-5	238
4.1.1 Acquisition TEMP/TDM et quantification.....	238
4.1.2 Biodistribution par prélèvements d'organes	239
5. Etudes <i>ex vivo</i> : Modèle expérimental de métastases pulmonaires	241
5.1 Autoradiographie	241
5.2 Mesure de l'expression de VCAM-1 par RT-qPCR	242
Discussion	244
Discussion Générale	250
Références bibliographiques	258

Liste des abréviations

AA : Acides Aminés

AcM : Anticorps Monoclonaux

ACN : Acétonitrile

ADC : Antibody-Drug-Conjugate

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

BLBC : Basal-Like Breast Cancer

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

BSA : Bovine Serum Albumin

CCI : Carcinome Canalaire Infiltrant

CCIS : Carcinome Canalaire *In Situ*

CCI : Carcinome Lobulaire Infiltrant

CLIS : Carcinome Lobulaire *In Situ*

CRC : ColoRectal Carcinoma

EDTA: Éthylènediaminetétraacétique

EMA : European Medicines Agency

EOC : Epithelial Ovarian Cancer

ER : Estrogen Receptor (Récepteur à l'œstrogène)

FDA : Food and Drug Administration

FDG : FluoroDésoxyGlucose

FES: Fluoro-17 β -œstradiol

Fv : Fragment variable

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

GRPR: Gastrin Releasing Peptide Receptor

HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor 2

HRP : HorseRadish Peroxydase

IHC : Immunohistochimie

LEMP : Leuco Encéphalopathie Multifocale Progressive
MEC : Matrice Extra Cellulaire
MMP : Matrix MetalloProteinase
MPF : Megakaryocyte Potentiating Factor
MSLN : Mésothéline
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PBS : Phosphate-Buffered Solution
PDAC : Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma
PFA: Paraformaldéhyde
PR : Progesterone Receptor (Récepteur à la Progestérone)
PSMA : Prostate Specific Membran Antigen
RH : Récepteurs Hormonaux
RIV : Radiothérapie Interne Vectorisée
SEP : Sclérose En Plaques
SMRP : Serum Mesothelin Related Peptide
SVF : Sérum de Veau Foetal
TAM : Tumor Associated Macrophages
TBR: Tumeur sur Bruit de fond (Tumor/Background Ratio)
TCA: Acide trichloroacétique
TDM : Tomodensitométrie
TEM : Transition Epithélium Mésenchyme
TEMP : Tomographie par émission monophotonique
TEP : Tomographie par émission de positons
TFA : Acide trifluoroacétique
TN : Triple Négatif
VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VLA-4 : Very Late Antigen-4

Introduction générale

Introduction générale

Le cancer du sein est la 2^{ème} cause de cancer dans la population générale et la première cause de cancer chez la femme. Au moment du diagnostic, chez 62 % des patientes, le cancer est uniquement localisé au niveau du site primitif et le taux de survie à 5 ans est de 98,9 %. En revanche, chez 31 % des patientes, les cellules tumorales ont envahi les ganglions régionaux et le taux de survie à 5 ans est de 85,2 %. Enfin chez 6 % des femmes, des métastases à distance sont présentes dès le diagnostic et le taux de survie à 5 ans n'est plus que de 22 %. De plus, parmi les femmes initialement diagnostiquées sans métastases, 20 % récidiveront avec des métastases à distance dans les 5 ans. Les métastases sont traitées par chimiothérapie ou thérapie ciblée, en fonction des résultats des études histologiques réalisées au niveau du site primitif. Cependant les biomarqueurs présents sur les cellules métastatiques peuvent être différents de ceux présents sur les cellules de la tumeur primaire. Ainsi, dans le cas du cancer du sein, il a été montré que 25 à 40 % de ces métastases ont des histologies discordantes de la tumeur primitive et que ces discordances existent également entre les différentes métastases. Il est donc primordial de disposer du phénotype des métastases pour adapter le traitement à leurs caractéristiques moléculaires. Toutes les métastases n'étant pas accessibles à la biopsie, leur phénotypage doit donc être envisagé de façon non invasive. L'imagerie nucléaire, imagerie moléculaire présentant une haute sensibilité, est parfaitement indiquée pour répondre à cette problématique. La médecine nucléaire est, à ce jour, la seule technique d'imagerie moléculaire disponible en pratique clinique.

Ce travail a été consacré au développement de deux radioligands impliqués dans le processus métastatique du cancer du sein.

La première partie de ce travail concerne l'évaluation pré-clinique de fragments d'anticorps de camélidés ou nanobodies ciblant la mésothéline (MSLN). La MSLN est une glycoprotéine à ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) très faiblement exprimée à l'état physiologique. Elle est surexprimée dans plus de 2/3 des cancers du sein triple négatif et son expression corrèle avec l'agressivité de ces

tumeurs. Elle est également fortement exprimée dans de nombreux cancers tels que les adénocarcinomes pancréatiques, les cancers ovariens ou encore pulmonaires. Sa très faible expression physiologique ainsi que sa surexpression dans les cancers les plus agressifs en font une cible thérapeutique pertinente. Ainsi, de nombreuses thérapies ciblant la mésothéline sont actuellement en phases d'essais cliniques. **Un agent d'imagerie ciblant cette protéine pourrait être un marqueur compagnon des thérapies en développement puisqu'il permettrait d'identifier les patientes susceptibles d'en bénéficier.**

La seconde partie de ces travaux concerne l'imagerie phénotypique des tumeurs du sein exprimant la protéine d'adhésion cellulaire VCAM-1. Récemment, l'intérêt grandissant pour la compréhension des processus de progression tumorale a conduit à l'identification de VCAM-1 comme acteur clé de la dissémination métastatique. En effet, l'expression de VCAM-1 par les cellules tumorales du sein leur confère des propriétés essentielles dans la dissémination métastatique à la fois au niveau du parenchyme pulmonaire mais aussi du tissu osseux, deux sites fréquents de colonisation du cancer du sein. Par ailleurs, plusieurs études cliniques suggèrent que l'expression de VCAM-1 dans le cancer du sein est associée à une évolution métastatique précoce. La valeur pronostique de l'expression de VCAM-1 dans la maladie métastatique n'a cependant jamais été évaluée. **Un agent d'imagerie ciblant VCAM-1 pourrait servir d'outil pour la caractérisation de l'agressivité de la maladie métastatique, permettant potentiellement de modifier la prise en charge du patient.**

L'objectif de ce travail a été de réaliser l'imagerie phénotypique des tumeurs métastatiques du sein en ciblant la mésothéline et la protéine VCAM-1 dans des modèles pré-cliniques de cancer du sein.

Introduction bibliographique

Introduction bibliographique

1. Données épidémiologiques

1.1 Incidence, mortalité et évolution du cancer du sein

➤ Au niveau mondial

Avec plus de 14 millions de nouveaux cas et près de 9 millions de décès dans le monde en 2014 d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer est de nos jours l'une des principales causes de mortalité. Selon les dernières projections de cet organisme on estime à 13 millions le nombre de décès qui seront imputables au cancer en 2030. Le cancer du sein est le cancer le plus diagnostiqué chez la femme. En 2018, on estime à 2 millions de nouveaux cas de cancers (25 % des nouveaux cas de cancers) et 629 000 décès, ce qui représente 15 % de la mortalité par cancer.

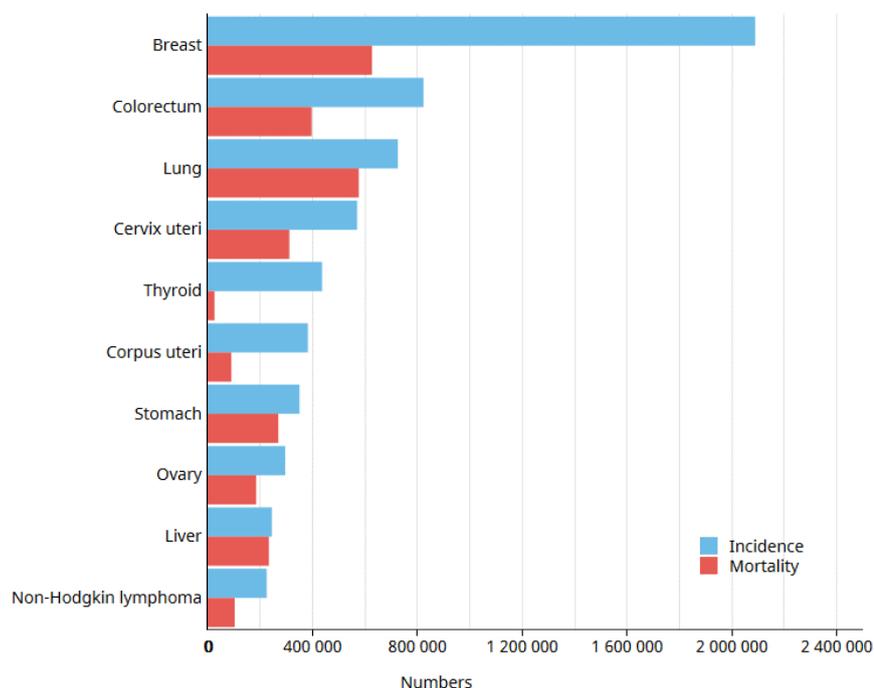


Figure 1. Incidence (bleu) et mortalité associée (rouge) chez la femme dans le monde en 2018. Nombre de cas estimés (Tiré de <http://gco.iarc.fr/today/home>, GLOBOCAN 2018, IARC).

➤ En France

Depuis 2004, le cancer est la 1^{ère} cause de mortalité en France, devant les maladies cardiovasculaires. En France, 399 626 nouveaux cas de cancers ont été recensés en 2017 (INCa) : 214 021 chez l'homme et 185 605 chez la femme. Chez la femme, le cancer du sein se situe au 1^{er} rang de tous les cancers : il représentait 31 % des nouveaux cas de cancers chez la femme en 2017. Avec 11 913 décès en 2015, le cancer du sein est au 1^{er} rang des décès par cancer chez la femme (19 %) et au 3^{ème} rang des décès par cancer, hommes et femmes confondus après le cancer du poumon et le cancer colorectal. Si l'on s'intéresse à l'évolution de l'incidence du cancer du sein en France, le nombre de nouveaux cas de cancer du sein a doublé entre 1980 et 2000 passant de 20 000 à plus de 40 000. Cette augmentation est en partie liée aux campagnes de dépistage, qui permettent de détecter des cancers précocement et donc à un stade moins agressif. Elle est également liée au vieillissement de la population et à l'évolution des modes de vie. Depuis 2005, l'incidence du cancer du sein est relativement stable. Malgré la forte augmentation de celle-ci entre 1980 et 2005, la mortalité a augmenté de 20 % durant cette période, puis est restée stable jusqu'à aujourd'hui.

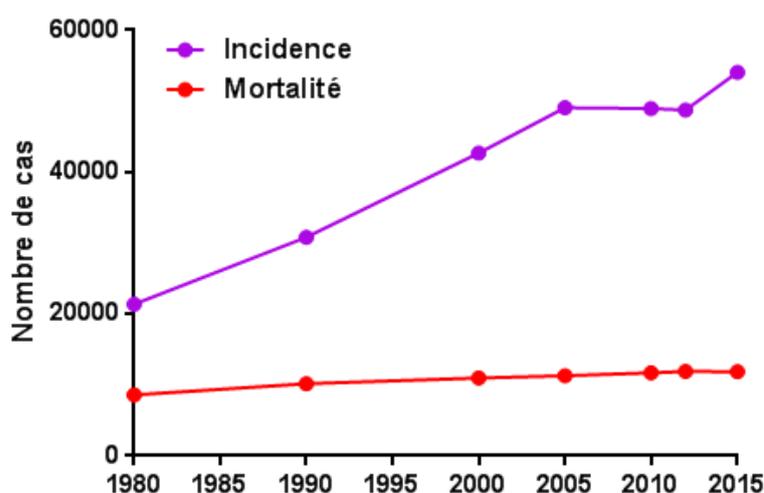


Figure 2. Evolution de l'incidence et de la mortalité du cancer du sein chez la femme de 1980 à 2012. Nombre de cas.

1.2 Facteurs de risque du cancer du sein

Le risque de développer un cancer du sein au cours de la vie est de 1 pour 8 (SEER Cancer Statistics Review, National Cancer Institute, 2012). Plusieurs facteurs de risque ont été recensés par le National Cancer Institute en 2012 et incluent :

➤ L'âge :

Le risque de développer un cancer du sein augmente avec l'âge et 79 % des nouveaux cas de cancer du sein concernent des patientes âgées de plus de 50 ans. Après 80 ans, l'incidence du cancer du sein diminue, ceci peut être expliqué soit par une détection plus précoce et donc une bonne prise en charge, soit par un dépistage plus faible voire inexistant.

➤ Les antécédents personnels :

Une femme qui a eu un cancer du sein présente un risque 3 à 4 fois plus élevé de développer un nouveau cancer du sein qu'une femme du même âge sans antécédent. De plus, le risque de développer un cancer du sein infiltrant est près de 10 fois plus élevé chez les femmes qui ont déjà eu un cancer canalaire *in situ* (CCIS) ou un cancer lobulaire *in situ* (CLIS) (Rosner et al., 1980 ; Wärnberg et al., 2001). D'autres affections bénignes des glandes mammaires, comme les hyperplasies atypiques, sont à l'origine d'une augmentation du risque de cancer du sein. Cette hyperplasie, asymptomatique, est caractérisée par une multiplication des cellules atypiques dans le sein. Elle est à l'origine d'une augmentation du risque de développer un cancer d'un facteur 3 (Hartmann et al., 2014).

➤ Les antécédents familiaux :

Près de 20 % des cancers du sein se manifestent chez des femmes ayant eu des antécédents familiaux de cancers. Le risque d'être atteint de ce cancer est 2 fois plus élevé chez les personnes dont une parente au premier degré a déjà eu un cancer du sein.

➤ Les prédispositions génétiques :

Seuls 5 à 10 % des cancers du sein sont héréditaires. Deux gènes de prédisposition au cancer du sein ont été caractérisés : il s'agit des gènes BRCA1 et BRCA2. Il s'agit d'onco-suppresseurs, impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Le risque de développer un cancer du sein chez les patientes possédant une mutation de ces gènes est compris entre 28 et 85 % (Ford et al., 1994 ; Levy-Lahad and Friedman, 2007).

➤ L'exposition aux œstrogènes :

L'exposition aux œstrogènes endogènes, dans le cas d'une puberté précoce avant 11 ans, d'une première grossesse tardive après 30 ans, ou d'une ménopause tardive après 55 ans, est à l'origine d'une augmentation du risque de développer un cancer du sein. La prise de contraceptifs oraux, qui représente une exposition exogène aux œstrogènes, augmente également ce risque (Beaber et al., 2014).

➤ Tabac et alcool :

La consommation de tabac est associée à une augmentation du risque de plusieurs cancers, dont le cancer du sein (Macacu et al., 2015 ; Warren et al., 2014). L'alcool constitue également un facteur de risque du cancer du sein. Une étude prospective, publiée en 2011 dans le JAMA, sur le suivi de 105 986 patientes, entre 1980 et 2008 a démontré que la consommation de trois à six verres de vin par semaine augmentait le risque de cancer du sein de 15 % (Chen et al., 2011).

➤ Obésité et diabète de type 2 :

L'hyperinsulinémie et le diabète de type 2 sont associés à un risque accru de développement d'un cancer du sein chez la femme ménopausée, un phénotype métastatique des tumeurs et une mortalité augmentée (Wolf et al., 2005 ; Larsson, Mantzoros, and Wolk, 2007 ; Xue and Michels, 2007). Ceci pourrait être dû à une surproduction par les cellules tumorales du récepteur à l'insuline, dont l'activation entraîne une cascade intracellulaire anti-apoptotique et pro-proliférative (Rose and Vona-Davis, 2012).

2. Le cancer du sein

2.1 Anatomie du sein

La fonction biologique du sein est de produire du lait destiné à nourrir le nouveau-né. Le sein se structure en 2 compartiments : le compartiment mésenchymateux (graisse, tissu conjonctif) et le compartiment épithélial qui s'articule autour d'un réseau de glandes et de canaux. Chaque sein est constitué de 15 à 20 lobules (ou glandes) responsables de la production de lait. Des canaux transportent le lait des lobules jusqu'au mamelon, région située au centre de l'aréole (figure 3). Chaque lobule contient 10 à 100 alvéoles (ou acini) qui constituent l'unité de base du sein. Il s'agit d'une cavité arrondie, en forme de cul de sac qui constitue la partie sécrétrice de la glande.

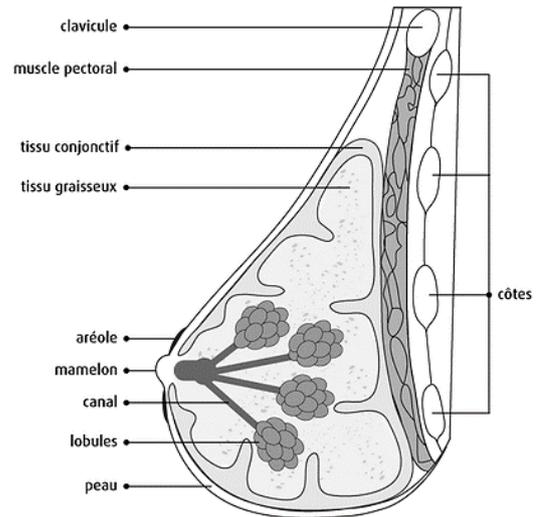


Figure 3. Anatomie du sein (Tiré de <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/breast>).

L'épithélium mammaire est constitué de deux types cellulaires différenciés : les cellules luminales et les cellules basales (figure 4). Les cellules luminales bordent la lumière des canaux et des lobules. Elles expriment les récepteurs à l'œstrogène (ER) et à la progestérone (PR). Les cellules basales ou cellules myoépithéliales entourent les cellules luminales et sont en contact avec la lame basale et le stroma environnant. Elles appartiennent à la famille des cellules musculaires lisses et c'est leur contraction qui permet l'excrétion du lait.

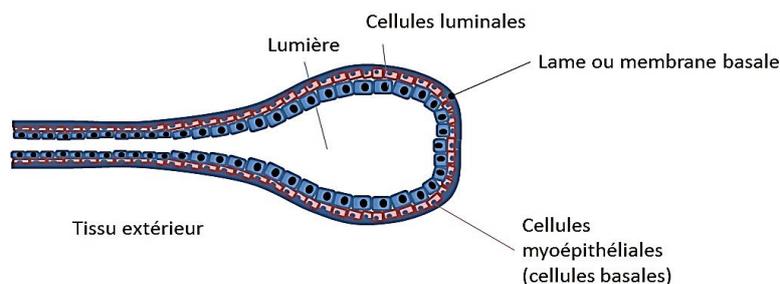


Figure 4. Schéma d'une coupe sagittale de glande mammaire.

Le sein contient de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques. Ces derniers recueillent et transportent la lymphe jusqu'aux ganglions lymphatiques. Plusieurs groupes de ganglions lymphatiques sont impliqués dans l'évacuation de la lymphe de chaque sein. Il s'agit des ganglions sus-claviculaires, sous-claviculaires, mammaires internes et axillaires (figure 5).

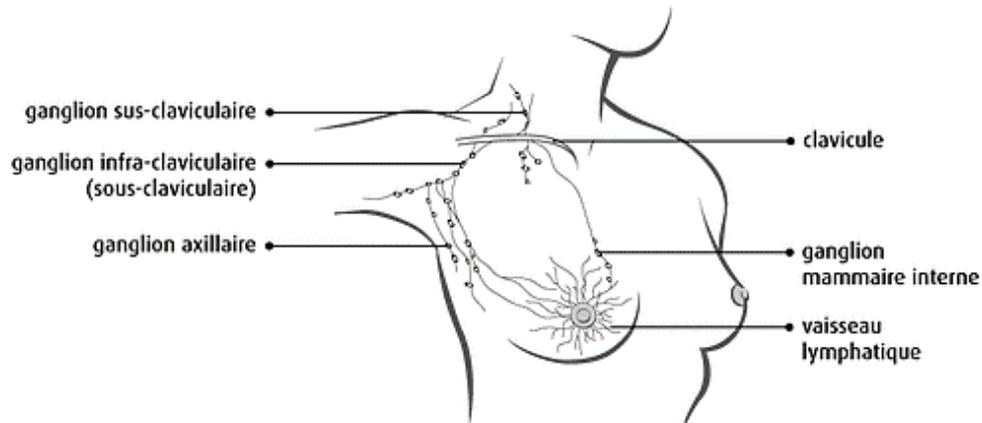


Figure 5. Ganglions lymphatiques du sein (Tiré de <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/breast>, Société canadienne du cancer).

Le développement de la glande mammaire débute à la puberté. Elle se développe et fonctionne sous l'influence des hormones sexuelles, œstrogènes et progestérone, fabriquées par les ovaires. Les œstrogènes sont impliqués dans le développement des seins au moment de la puberté et préparent le corps à la gestation au moment de la grossesse. La progestérone est impliquée dans la différenciation des cellules du sein et dans le cycle menstruel.

2.2 Cancer du sein

La glande mammaire est, sous l'effet d'hormones et de facteurs de croissance, en permanente évolution, ce qui la rend particulièrement susceptible aux transformations cancéreuses. Le cancer correspond à une prolifération anarchique de cellules d'un tissu ou d'un organe et l'initiation d'une tumeur peut être causée par de multiples dérégulations de processus physiologiques (figure 6) (Hanahan and Weinberg, 2011).

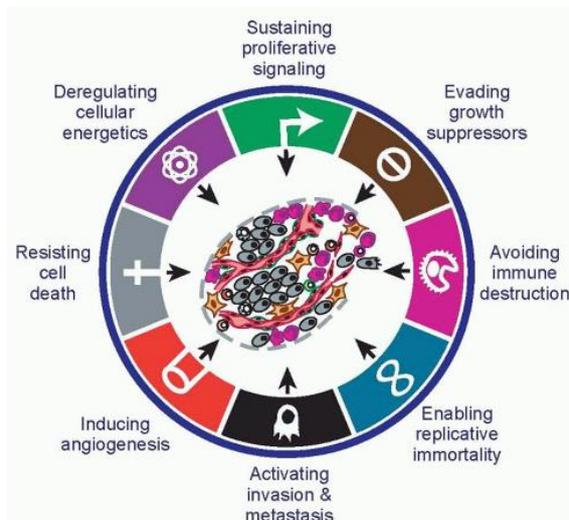


Figure 6. Hallmarks of Cancer (Hanahan and Weinberg, 2011).

Le processus de transformation d'une cellule normale à cancéreuse se déroule en plusieurs étapes (figure 7). La première est la phase d'**initiation** qui ne concerne qu'une seule cellule. Cette phase est caractérisée par l'introduction, dans l'ADN de la cellule, de lésions transmissibles aux cellules filles. Ces cellules tumorales perdent la sensibilité vis-à-vis des signaux régulant leur prolifération et deviennent immortelles. La seconde phase est la phase de **promotion** tumorale : les cellules prolifèrent localement et pérennisent les anomalies au cours des divisions cellulaires. On parle de lésion précancéreuse, avec un stade de transformation tumorale encore réversible. La **progression** tumorale est la 3^{ème} phase. Elle est caractérisée par une croissance tumorale accrue, où les cellules ont échappé aux mécanismes de régulation de l'organisme. Ces cellules peuvent alors se détacher de la tumeur primaire pour gagner la lymphe et la circulation sanguine et former des métastases à distance. Les processus de dissémination métastatique sont détaillés dans la partie 3 (page 32).

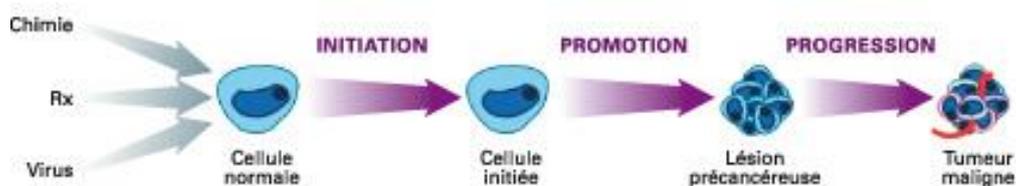


Figure 7. Processus de cancérogenèse.

2.3 Classifications des cancers du sein

Il existe différents types de cancer du sein selon les cellules à partir desquelles ils se développent. L'immense majorité d'entre eux (95 %) sont des adénocarcinomes, c'est-à-dire qu'ils se développent à partir des cellules épithéliales de la glande mammaire. Ces adénocarcinomes naissent le plus souvent à partir des cellules canalaire. Dans le but d'administrer le traitement le mieux adapté à chaque patiente, les cancers du sein ont été classés en deux catégories : histologique et moléculaire (Malhotra et al., 2010).

2.3.1 Classification histologique

Le type histologique du cancer du sein est un élément déterminant pour la conduite thérapeutique à suivre et l'évaluation du pronostic. D'un point de vue histologique, les tumeurs du sein peuvent être classées en deux groupes : les carcinomes *in situ* et les carcinomes infiltrants.

➤ Les carcinomes *in situ*

On parle de carcinomes *in situ* lorsque les cellules tumorales se trouvent uniquement à l'intérieur des canaux ou des lobules, sans que la tumeur ait franchi la membrane basale. Ces cancers ne comportent donc théoriquement pas de risque d'envahissement ganglionnaire. Parmi ceux-là, le carcinome canalaire *in situ* (CCIS) est le plus fréquent puisqu'il représente 80 % de ces cancers.

➤ Les carcinomes invasifs

Lorsque les cellules ont infiltré le tissu entourant les canaux ou les lobules, on parle de carcinome infiltrant. Ces cancers infiltrants sont le plus souvent de type canalaire (Cancer Canalaire Infiltrant ou CCI) (70 %). Ils se forment le long des canaux galactophores et sont caractérisés par une invasion des tissus environnants. Le carcinome lobulaire infiltrant (CLI) est plus rare et se développe au niveau des lobules. D'autres formes rares de carcinomes mammaires existent tels que les carcinomes médullaires, mucineux et tubuleux, et ne seront pas décrits ici.

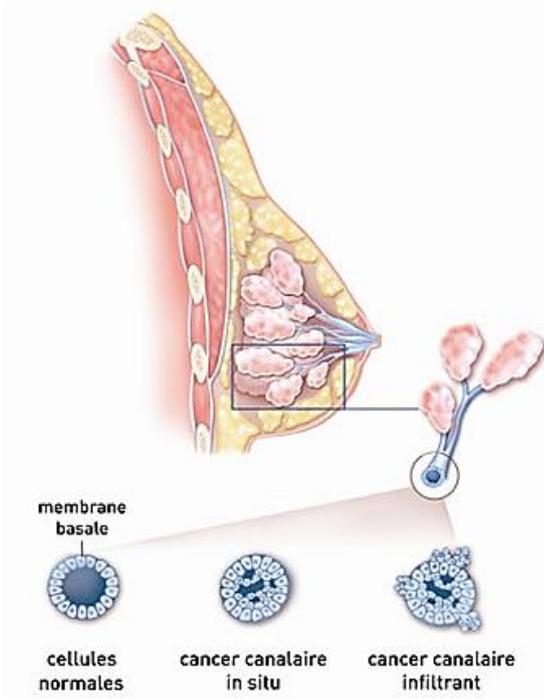


Figure 8. Représentation schématique d'un cancer canalaire *in situ* vs infiltrant (Tiré de <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Anatomie-du-sein>, Institut National du cancer).

Les données histologiques obtenues après une biopsie des tumeurs primaires sont à l'origine de la constitution d'un grade tumoral, reflet de l'agressivité du cancer. Il existe plusieurs modalités d'établissement du grade histo-pathologique, le plus utilisé étant celui de Scarff-Bloom-Richardson (SBR) (Bansal et al., 2012). Le grade tumoral apporte une information pronostique indépendante de la taille de la tumeur et de l'envahissement ganglionnaire. Trois paramètres morphologiques sont déterminés :

- Le degré de différenciation tumorale : il correspond à l'apparence des cellules tumorales.
- L'aspect du noyau : la taille et la forme du noyau sont évaluées.
- L'index de mitose : le nombre de cellules en mitose est déterminé.

Une note est attribuée pour chacun de ces critères et la somme des notes constitue le grade tumoral.

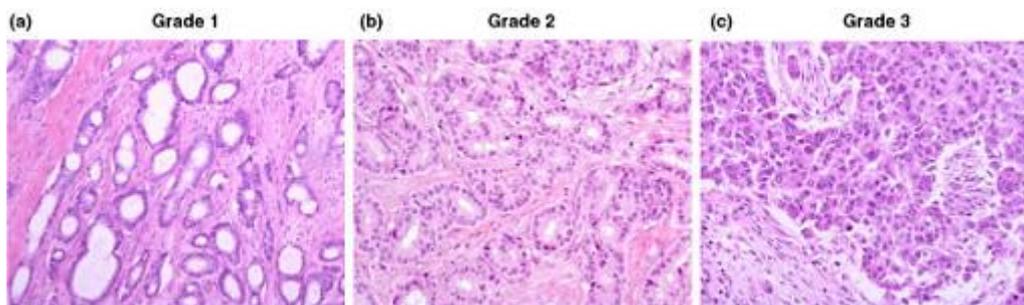


Figure 9. Grade histologique du cancer du sein. (a) Tumeur différenciée de grade I, (b) tumeur différenciée de grade II, (c) tumeur de grade III avec pléomorphisme nucléaire et cellules en mitose (Rakha et al., 2010).

Les survies globales et sans récurrence sont plus courtes pour les tumeurs de grade III que pour celles de grade I et II (Rakha et al., 2010). Le grade tumoral constitue par ailleurs un marqueur prédictif de réponse à la chimiothérapie, les tumeurs de grade III répondant mieux que celles de grade I et II (Pinder et al., 1998).

2.3.2 Classification moléculaire

En parallèle de la classification histologique, une classification du cancer du sein a été effectuée à partir de marqueurs moléculaires (Sørli et al., 2001 ; Eroles et al., 2012). Au 19^{ème} siècle, Beatson a été le premier à suggérer l'implication de l'œstradiol dans les cancers mammaires. Il a pu démontrer que les lapines stérilisées par chirurgie développaient moins de tumeurs mammaires que les autres (Beatson, 1896). Ce n'est que plus tard que ces données ont pu être confirmées avec la découverte du récepteur à l'œstradiol ou aux œstrogènes (ER) (Toft and Gorski, 1966 ; Toft, Shyamala, and Gorski, 1967). De la même manière que le récepteur à l'œstrogène, le récepteur à la progestérone (PR) a lui aussi été découvert comme marqueur des cancers du sein (McGuire et al., 1977). Ces deux récepteurs constituent les récepteurs hormonaux (RH) et sont systématiquement recherchés lors du diagnostic de cette pathologie. En parallèle de ces 2 marqueurs, la présence de HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), un proto-oncogène impliquée dans la progression tumorale, est également recherchée.

Plus récemment, avec l'essor des nouvelles techniques d'analyse utilisant les puces à ADN, une nouvelle classification moléculaire issue de la génomique a

émergé (Perou, Sorlie, Eisen, et al., 2000 ; Sorlie et al., 2003). Ainsi, des recherches basées sur l'expression de milliers de gènes (ARNm) ont permis d'identifier au moins 5 sous-classes moléculaires majeures : luminal A, luminal B, basal-like, normal-like et HER2.

➤ [Les tumeurs lumineales](#)

Les tumeurs lumineales ont des profils d'expression de gènes codants pour les cellules épithéliales de la lumière des canaux ou des lobules (Perou, Sorlie, Eisen, et al., 2000). Le sous-type **luminal A** est le sous-type le plus fréquent puisqu'il représente à lui seul près de 40 % des cancers du sein (Kumar et al., 2015). Ces tumeurs sont caractérisées par une expression des récepteurs aux œstrogènes ER et à la progestérone PR. Elles correspondent à des cancers de bas grade (grade I), à faible index de prolifération (marquage Ki-67 < 20 %) et de pronostic favorable. Ces tumeurs peuvent être traitées par hormonothérapies. Le sous-type **luminal B** est également caractérisé par une expression des récepteurs ER et PR pouvant être associée ou non à celle de HER2. Ces tumeurs sont majoritairement des tumeurs de grade II ou III et affichent de hauts niveaux d'expression du marqueur prolifératif Ki-67 (> 20 %) (Cheang et al., 2009). De ce fait, le sous-type luminal B est de moins bon pronostic que le sous-type luminal A (Perou, Sorlie, Eisen, et al., 2000 ; Sorlie et al., 2003).

➤ [Les tumeurs HER2](#)

Le sous-type **HER2** représente 15 à 20 % des cancers du sein. Ce sont des cancers ER-, PR- et caractérisés par une forte expression de la protéine HER2, un proto-oncogène impliqué dans les mécanismes de prolifération cellulaire (Ullrich and Mcguire, 1987 ; Callahan and Hurvitz, 2011). Il s'agit de cancers de grade II-III et caractérisés par de hauts niveaux de l'index prolifératif Ki-67. Ils sont donc de plus mauvais pronostic que les cancers lumineux (Hoff et al., 2002 ; Shokouh, Ezatollah, and Barand, 2015). Des thérapies ciblées (Trastuzumab, Herceptin®) ont été développées et ont contribué à l'amélioration du pronostic des patientes présentant ce sous-type (Slamon et al., 2011 ; Maximiano et al., 2016).

➤ Les tumeurs basal-like

Les tumeurs basal-like ont un profil d'expression génétique proche de celui des cellules myo-épithéliales constituant le compartiment basal de la glande mammaire, d'où leur nom. Les « **Basal-Like Breast Cancer** » (BLBC) représentent 15 à 20 % des cancers mammaires (Badowska-Kozakiewicz and Budzik, 2016). Ce sont des tumeurs de haut grade (grade II ou III). Le pronostic des patients avec un BLBC est péjoratif, du fait du caractère fortement prolifératif de ces tumeurs et de l'absence de thérapie efficace disponible en routine clinique (Toft and Cryns, 2011 ; Liedtke et al., 2008). Une expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion cellulaire est retrouvée dans ces tumeurs (Toft and Cryns, 2011). Elles sont caractérisées par l'expression des cytokératines 5 et 6 (CK5/6), du récepteur EGFR, et présentent une mutation de la protéine P53 dans 80 % des cas (Nielsen et al., 2004 ; Nakai, Hung, and Yamaguchi, 2016 ; Bertheau et al., 2013). Elles présentent également une fréquence élevée de mutations génétiques, notamment concernant des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, tels que le gène BRCA1 (Foulkes, 2003). La grande majorité d'entre elles n'expriment ni les récepteurs hormonaux ER et PR, ni HER2 : elles sont dites **triple-négatives** (TN) (figure 10). Il subsiste néanmoins un débat sur l'intérêt de la distinction des TN et BLBC. Certains auteurs considèrent que les 2 populations sont superposables et leur distinction ne modifie pas la prise en charge thérapeutique. Ils s'appuient sur le fait que l'identification des BLBC requiert des méthodes complexes, coûteuses et non complètement validées (Rakha et al., 2007). D'autres auteurs défendent la nécessité d'une distinction entre les 2 entités (Alluri and Newman, 2014). En effet, bien qu'il existe un recoupement entre les tumeurs TN et le phénotype **basal-like**, 20 à 30 % des cancers du sein TN ne sont pas BLBC et 20 % des BLBC ne sont pas TN (figure 10) (Diéras et al., 2010).

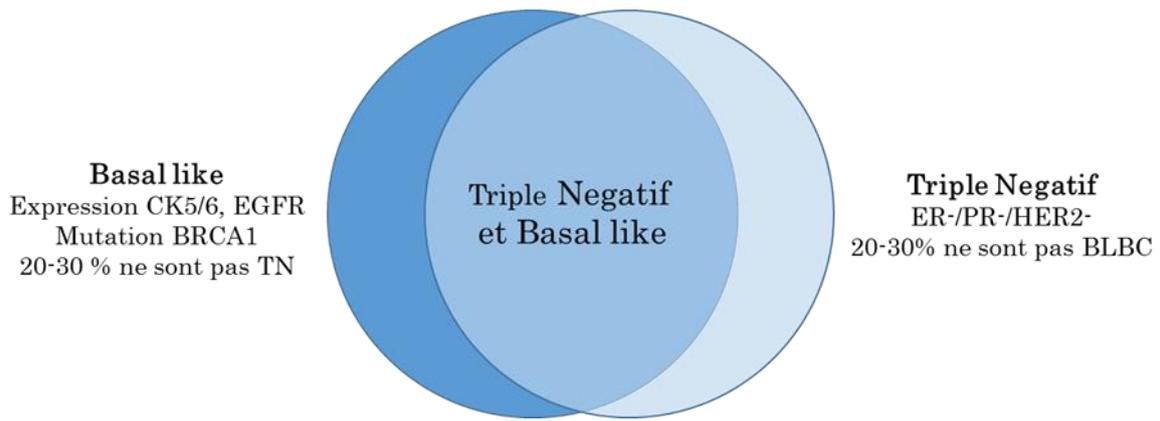


Figure 10. Cancer triple négatif (TN) et cancer basal-like (BLBC).

Les cancers du sein **normal-like** sont similaires à ceux du type luminal A : ER⁺ et/ou PR⁺, HER2⁻. Cependant, cette appellation tend à disparaître puisqu’il s’agirait d’un artefact de dilution de l’ARN tumoral dans du tissu mammaire sain.

Catégories moléculaires	Basal/Triple Négatif	HER2	Luminal B	Luminal A
% des cancers du sein	15 à 20 %	15 à 20 %	20 %	40 %
Expression récepteurs		HER2	HER2, ER ⁺ , PR ⁺	ER ⁺ , PR ⁺
Grade	Grade III			Grade I

Tableau 1. Tableau récapitulatif des sous-groupes moléculaires des cancers du sein.

➤ Dissémination métastatique et sous-types de tumeurs.

Le potentiel des cellules tumorales à disséminer, très lié à la survie globale des patientes, est fortement dépendant du sous-type tumoral (Anders and Carey, 2009). Les tumeurs basales et HER2 représentent les sous-types de cancer du sein au pronostic le plus péjoratif, avec une survie sans métastase et une survie globale diminuées par rapport aux tumeurs lumineales de type A et B. Parmi les tumeurs lumineales, le sous-type A est celui au pronostic le plus favorable (figure 11) (Sorlie et al., 2003 ; Sørlie et al., 2001 ; Anders and Carey, 2009 ; Hoeflerlin, Chalfant, and Park, 2013).

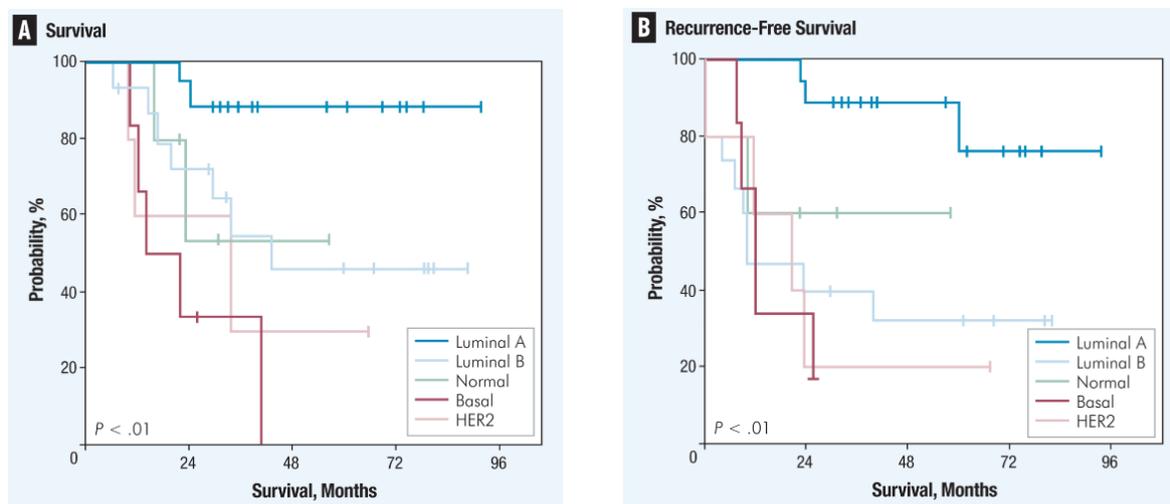


Figure 11. Survie des patients selon le sous-type tumoral. A) Survie globale et B) survie sans métastase des patients avec différents sous-types de cancer du sein (Anders and Caray, 2009).

Les cancers du sein disséminent préférentiellement au niveau de 4 organes : le foie, le poumon, l'os et le cerveau, et les sites préférentiels de dissémination métastatique sont dépendants des sous-types tumoraux (figure 12) (Largillier et al., 2008 ; Wu et al., 2017). Si l'os est le site de colonisation prédominant pour les tumeurs lumineales A et B, la distribution des tumeurs secondaires est plus hétérogène pour les sous-groupes HER2 et basal, avec un plus grand taux de métastases cérébrales et pulmonaires (Tham et al., 2006 ; Smid et al., 2008). Le risque de développer des métastases cérébrales pour les sous-types basal et HER2 est 4 fois plus important que pour les sous-types lumineux (Witzel et al., 2016).

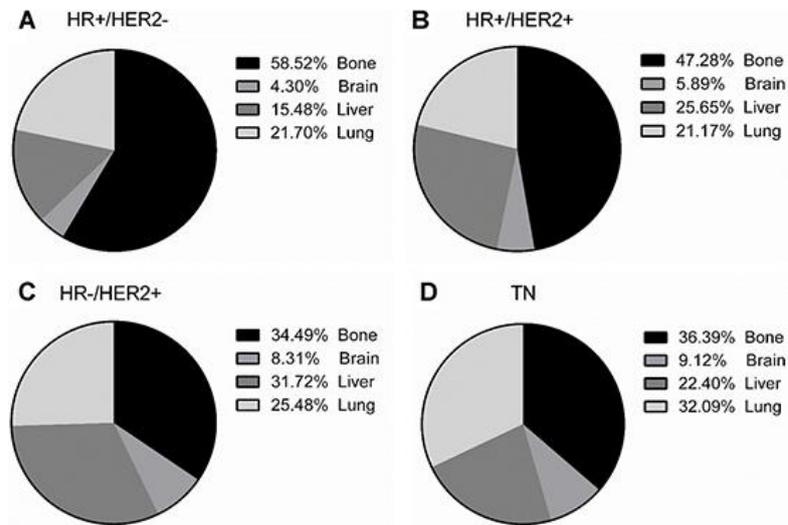


Figure 12. Sites préférés de dissémination métastatique selon le sous-type tumoral (Wu et al., 2017). HR : Hormone receptors, TN : Triple-negative.

2.4 Facteurs pronostiques du cancer du sein

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le sous-type de cancer du sein ainsi que le grade de la tumeur primaire sont des marqueurs pronostiques avérés. Le devenir du patient est également fortement dépendant du stade tumoral au moment du diagnostic, c'est-à-dire de l'état d'avancement de la maladie (Orucevic et al., 2015). Le stade tumoral se structure à partir de la classification TNM. La classification T (taille de la tumeur), N (envahissement ganglionnaire) et M (présence de métastase) est un élément pronostique du cancer du sein. La taille de la tumeur varie de T0 à T4, T0 étant lié à une tumeur non palpable, T1 à une tumeur inférieure à 2 cm, T2 une tumeur comprise entre 2 et 5 cm, T3 une tumeur supérieure à 5 cm et T4 une tumeur envahissant la peau, les muscles ou les côtes. La colonisation ganglionnaire est également évaluée, et classée de N0 à N3 selon le nombre de ganglions atteints et leur localisation (N0 : absence d'envahissement ganglionnaire régional ; N1 : envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires et/ou de la chaîne mammaire interne (CMI) ; N2 : envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires ou envahissement de la CMI en l'absence d'envahissement ganglionnaire axillaire ; N3 : envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires ou envahissement des ganglions sous-claviculaires et CMI). Enfin 2 stades M sont évalués, selon qu'il y a ou non colonisation d'un organe à distance (M0 : pas de

métastases, M1 présence de métastases à distance). Quatre stades de cancer du sein ont ainsi été établis à partir de cette classification et sont représentés dans le tableau 2 ci-dessous.

Stade I	T1 N0 M0
Stade IIA	T0 N1 M0 ; T1 N1 M0 ; T2 N0 M0
Stade IIB	T2 N1 M0 ; T3 N0 M0
Stade IIIA	T0 N2 M0 ; T1 N2 M0 ; T2 N2 M0 ; T3 N1 M0 ; T3 N2 M0
Stade IIIB	T4 N0 M0 ; T4 N1 M0 ; T4 N2 M0
Stade IIIC	Tous T N3 M0
Stade IV	Tous T Tous N M1

Tableau 2. Classification TNM des cancers du sein

Le stade III correspond à des cancers localement avancés, avec atteinte des ganglions loco-régionaux et le stade IV constitue le cancer du sein métastatique avec atteinte d'organes à distance (foie, poumons, os, cerveau).

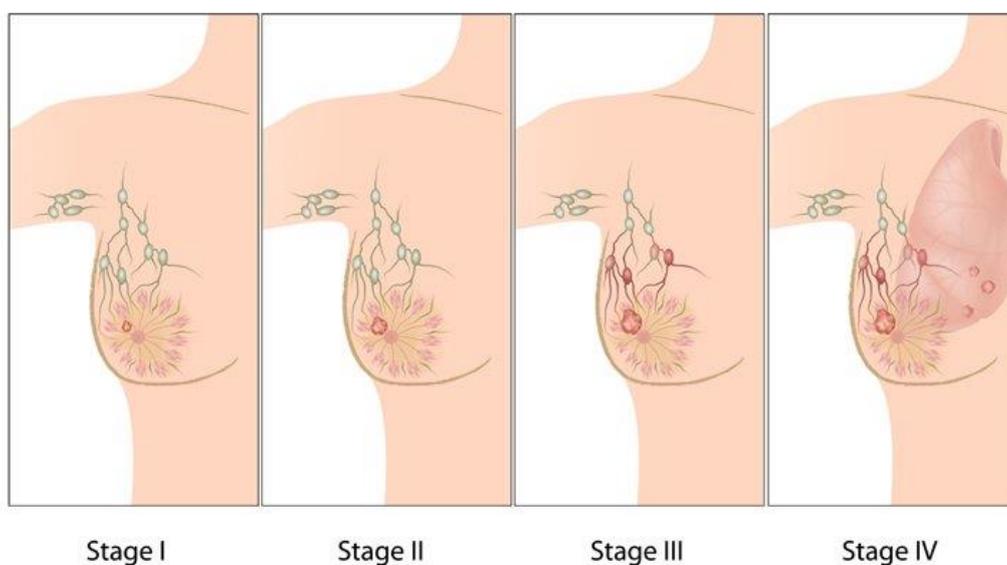


Figure 13. Stades cliniques du cancer du sein.

Le stade du cancer est un bon marqueur pronostique. Les patientes atteintes d'un cancer du sein de stade I ou II ont une survie à 5 ans excellente. Les patientes avec un cancer du sein métastatique, avec soit un envahissement ganglionnaire local (stade III), soit des métastases à distance (stade IV), ont un pronostic beaucoup plus péjoratif (tableau 3).

Stade I	Stade II	Stade III	Stade IV
98 %	93 %	72 %	22 %

Tableau 3. Survie à 5 ans des patientes atteintes de cancer du sein selon le stade tumoral au moment du diagnostic (<https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer>, American Cancer Society).

L'âge des patientes est également un marqueur pronostique. En effet, le cancer du sein qui affecte les femmes jeunes (< 40 ans) est souvent plus agressif, de haut grade, plus avancé au moment du diagnostic, avec un risque accru de récurrence (Assi et al., 2013).

3. Dissémination métastatique

3.1 Principes généraux

L'immense majorité des décès imputables au cancer est la conséquence de la dissémination métastatique (Seyfried and Huysentruyt, 2013). Le processus de dissémination métastatique des cellules tumorales reste cependant encore mal connu. Lorsque le diagnostic d'un cancer du sein est établi, un tiers des patientes présente déjà une maladie métastatique, puisque 32 % d'entre elles présentent une atteinte ganglionnaire loco-régionale et 5 % des métastases à distance (Surveillance, Epidemiology and End Results Program, National Cancer Institute, 2013). De plus, et ce malgré les avancées majeures dans la prise en charge thérapeutique du cancer du sein, plus de 20 % des patientes initialement diagnostiquées avec un cancer non métastatique, c'est-à-dire identifiées au stade I, vont rechuter avec métastases à distance (Group Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, 2005).

Le mot métastase provient du grec ancien *metastasis* « je change de place » et désigne des tumeurs secondaires à une tumeur primitive. La dissémination métastatique est un processus hautement complexe (Hunter, Crawford, and Alsarraj, 2008). Il peut se définir comme une dissémination de cellules tumorales dans un site secondaire et distant, au sein duquel ces cellules vont proliférer et former une masse. Le moment d'apparition des métastases dans l'histoire du cancer est variable. Elles peuvent être révélatrices d'une tumeur primitive jusqu'ici asymptomatique et ignorée (par exemple, une métastase cérébrale peut révéler un mélanome non diagnostiqué), être contemporaines de la tumeur primitive, ou ne survenir que plus tardivement au cours de l'évolution de la pathologie, des mois ou des années après l'éradication de la tumeur primitive.

Lors de la dissémination dans l'organisme, des cellules tumorales quittent le foyer primaire initial, par l'intermédiaire des vaisseaux lymphatiques ou sanguins. Ce processus complexe nécessite plusieurs étapes, les cellules tumorales doivent en effet :

- Se détacher de la masse tumorale et traverser la matrice extracellulaire (MEC). Ce phénomène porte le nom d'invasion tumorale.
- Passer dans la circulation sanguine ou lymphatique : intravasation.
- Survivre dans cette circulation.
- Sortir de la circulation : extravasation.
- Survivre et proliférer dans un nouveau site à distance du site primaire.

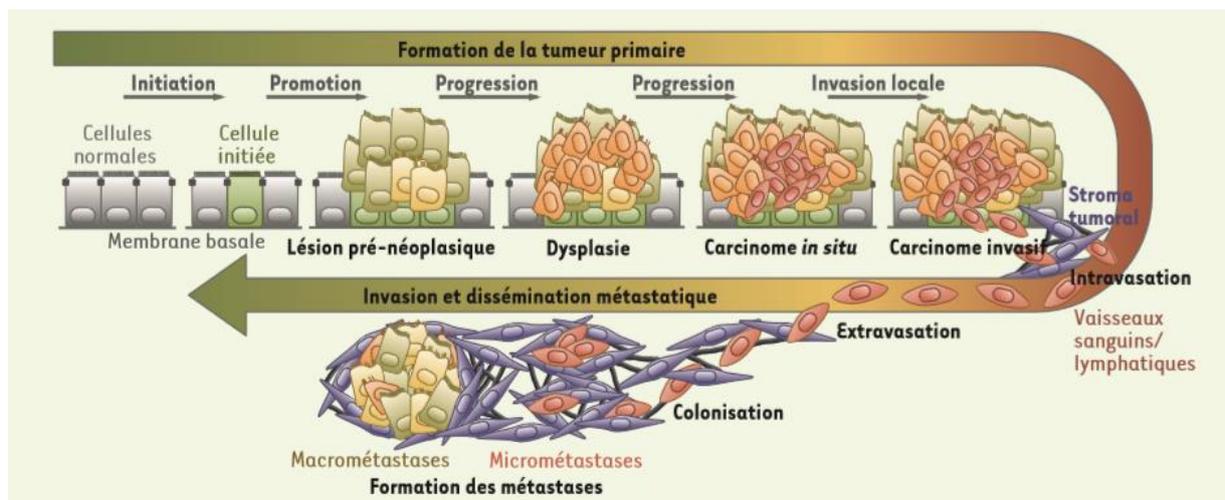


Figure 14. Principales étapes de la cascade métastatique. La cascade métastatique est initiée par une phase d'invasion locale, menant au carcinome invasif. Elle est suivie d'une phase d'intravasation, marquant l'entrée des cellules tumorales dans la circulation sanguine ou lymphatique. Certaines cellules pourront alors coloniser un organe à distance pour former des micro-métastases puis des macro-métastases détectables (Moyret-Lalle C et al., 2016).

Il s'agit d'un processus séquentiel, d'où la terminologie de « cascade métastatique » (figure 14). Plusieurs principes généraux gouvernent la cascade métastatique (Fidler, 2003) :

1. Le processus métastatique dépend des propriétés intrinsèques aux cellules tumorales, mais aussi des interactions cellules-micro-environnement.
2. Ce processus est hautement sélectif et particulièrement inefficace puisqu'il est admis que moins de 0,02 % des cellules entrant dans la circulation sanguine parviennent à former des métastases cliniquement détectables.

3. Le profil de dissémination métastatique n'est pas aléatoire (théorie de la graine et du sol de Paget).

3.2 Micro-environnement tumoral

Il est aujourd'hui admis qu'une tumeur ne peut croître sans partenaires. La progression tumorale est certes le fruit de dérégulations génétiques de cellules tumorales, mais également le produit d'une interaction dynamique entre ces cellules et des éléments extérieurs. Ces derniers constituent ce qui est classiquement appelé le **micro-environnement tumoral** (figure 15). Le micro-environnement tumoral intervient à toutes les étapes de la progression tumorale et va moduler le comportement des cellules tumorales à travers divers signaux (facteurs de croissance, cytokines) (Quail and Joyce, 2013). La formation de ce micro-environnement est induite par les cellules tumorales elles-mêmes et il se compose de plusieurs éléments :

- **Fibroblastes (Cancer Associated Fibroblastes)**

Les fibroblastes constituent la majeure partie du micro-environnement et sont responsables de la synthèse de la MEC à travers la sécrétion du collagène et de la fibronectine (Tomasek et al., 2002). Ils peuvent également sécréter du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) et ainsi stimuler l'angiogenèse. Ils sont également une source de protéases impliquées dans la dégradation de cette MEC (Kessenbrock, Plaks, and Werb, 2010).

- **Adipocytes**

Les adipocytes constituent également un élément clé du micro-environnement tumoral en sécrétant des adipokines pour le recrutement des cellules tumorales, et en fournissant des acides gras comme carburant des cellules tumorales (Nieman et al., 2011).

- **Vaisseaux sanguins et lymphatiques**

Au cours de la croissance tumorale, il y a nécessité de création de réseaux lymphatiques et sanguins.

- **Matrice-extracellulaire (MEC)**

La MEC sert non seulement au soutien et à l'adhésion des cellules du parenchyme tumoral, mais peut également jouer un rôle actif dans la progression tumorale. Il s'agit d'un réseau complexe de protéines et de protéoglycanes. Les composants de la MEC peuvent être clivés et relarguer de nombreux facteurs pro-tumoraux (TGF β , FGF) (Lanigan et al., 2007). Le remodelage de cette MEC est à l'origine de la création d'un environnement favorable à l'invasion des cellules tumorales.

- **Cellules du système immunitaire**

La présence de cellules de l'immunité constitue un élément clé du micro-environnement tumoral. Les **macrophages** ou TAM pour Tumor Associated Macrophages représentent la composante inflammatoire majoritaire du stroma tumoral. Ils possèdent une activité pléiotrope dans le développement tumoral, ils sont capables de promouvoir l'angiogenèse et de créer un environnement propice à la dissémination métastatique (Mantovani, 2005). De plus, les TAM secrètent du VEGFC, facteur clé de la lymphangiogenèse et à l'origine de dissémination lymphatique (Schoppmann et al., 2006). Dans le cancer du sein, la présence des TAM est associée à un mauvais pronostic (Leek et al., 1996). Ces TAM jouent par ailleurs un rôle dans l'invasion tumorale à travers la sécrétion des métalloprotéases (MMP) (Klein and Bischoff, 2011). Les **neutrophiles** possèdent également une action pro-tumorale (Pekarek et al., 1995). Comme les TAM, ils sont capables d'induire la migration des cellules tumorales et de participer à l'angiogenèse (Shamamian et al., 2001). Les **lymphocytes** sont également présents dans cet environnement et ont un rôle soit pro- soit anti-tumoral, selon le type de lymphocytes mis en jeu mais aussi selon le type de tumeurs. Dans le cancer du sein, il s'agit majoritairement de lymphocytes T (80 %). La présence de lymphocytes T infiltrants dans les cancers du sein TN est associée à un bon pronostic (Stovgaard et al., 2018). De nombreux autres rôles de ces cellules ont été décrits et ne seront pas détaillés ici.

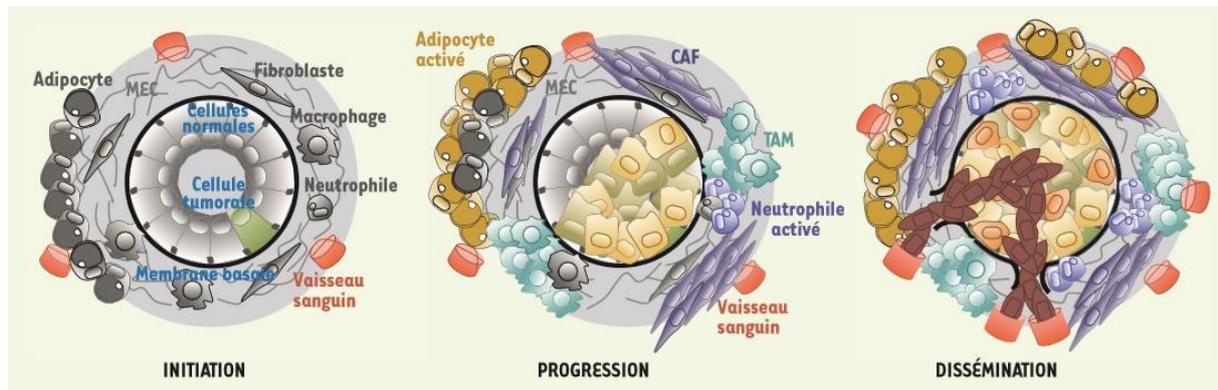


Figure 15. Rôle du micro-environnement dans la progression tumorale. Le stroma tumoral et la MEC subissent des changements au cours de la progression tumorale. Les monocytes se différencient en TAM, macrophages activés, qui favorisent l'angiogenèse et la croissance tumorale. Les fibroblastes et les adipocytes sécrètent des facteurs de croissance et des métallo-protéases facilitant l'intravasation (Moyret-Lalle C et al., 2016).

La progression tumorale et la dissémination métastatique résultent donc d'une interaction complexe entre cellules tumorales et micro-environnement (Junttila and de Sauvage, 2013).

3.3 Mécanismes moléculaires de la cascade métastatique

➤ Angiogenèse et lymphangiogenèse tumorale

Au stade initial, la tumeur est avasculaire (Holash, Wiegand, and Yancopoulos, 1999). Quand elle atteint une taille d'environ 2 mm, sa croissance va dépendre de sa faculté à former des nouveaux vaisseaux sanguins (Brooks, 1996) pour assurer un apport suffisant en oxygène et en nutriments aux cellules. La création de néo-vaisseaux se fait à partir de vaisseaux pré-existants et porte le nom d'angiogenèse. Ce passage d'une phase avasculaire à la phase vasculaire marque un véritable « switch angiogénique » où les stimuli pro-angiogéniques prennent le pas sur les stimuli anti-angiogéniques (Bergers and Benjamin, 2003). Au cours de ces processus, les cellules tumorales produisent du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), un facteur de croissance endothélial libéré dans l'espace extra-cellulaire (Guo et al., 2003). D'autres facteurs participent également à l'angiogenèse comme le FGF (Fibroblast Growth Factor) ou le PDGF (Platelet-

derivated Growth Factor). Les cellules endothéliales vont alors proliférer et migrer en direction de la tumeur. L'angiogenèse constitue l'étape clé de la progression tumorale, on la retrouve non seulement au début du processus de cancérogenèse mais aussi au cours de l'implantation métastatique où les cellules ayant colonisé un nouveau site nécessitent des apports nutritifs conséquents pour se développer (Bielenberg and Zetter, 2015).

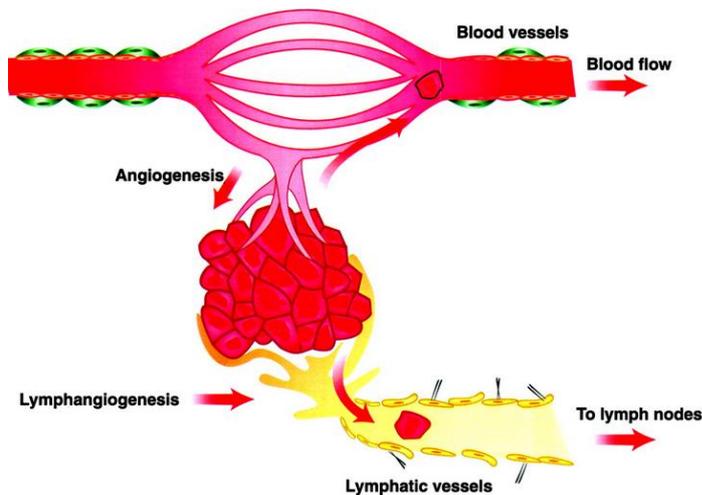


Figure 16. Angiogenèse et lymphangiogenèse tumorale. Les réseaux sanguins et lymphatiques constituent deux voies majeures de dissémination métastatique (Alitalo K et al., 2004).

De manière concomitante à la création de nouveaux vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques sont créés (figure 16). Ce phénomène porte le nom de lymphangiogenèse (Alitalo, Mohla, and Ruoslahti, 2014). Des facteurs clés de la lymphangiogenèse ont été identifiés, tels que le marqueur membranaire podoplanine ou les facteurs de croissance VEGF-C et VEGF-D (Breiteneder-Geleff et al., 1999 ; Feng et al., 2010). Ils induisent la prolifération des cellules endothéliales lymphatiques et contribuent ainsi au développement du réseau lymphatique.

C'est par l'intermédiaire de ces deux réseaux que les cellules tumorales vont pouvoir migrer et rejoindre les ganglions sentinelles et les sites secondaires (foie, poumon, os, cerveau). Les vaisseaux lymphatiques et sanguins sont tapissés d'une couche de cellules endothéliales, sur leur face interne. Leur face apicale est en contact avec la lumière du vaisseau tandis que la face basale repose sur une lame basale constituée de collagène. Les cellules métastatiques vont devoir franchir ces structures lors de l'intravasation, puis plus tard et à distance, lors de

l'extravasation. Ces deux processus étant essentiels à la progression tumorale et la dissémination métastatique, leur ciblage pourrait être particulièrement intéressant. C'est dans ce sens que des traitements anti-angiogéniques ont déjà été développés et sont couramment utilisés dans la prise en charge de cancers métastatiques (ciblage du VEGF avec un anticorps neutralisant : le Bevacizumab ou l'Avastin®) (Ferrara, Hillan and Novotny, 2005). Bien qu'aucune thérapie anti-lymphangiogénique ne soit encore disponible en pratique clinique, des traitements ciblant ce processus pourraient voir le jour (Raica, Jitariu, and Cimpean, 2016).

➤ [Invasion tumorale et adhésion cellulaire](#)

Parallèlement à la création de vaisseaux sanguins et lymphatiques, les cellules tumorales subissent d'importants changements nécessaires à l'invasion, comme la dégradation du stroma tumoral et la migration cellulaire. Dans ces phénomènes, les changements d'interaction cellules-cellules et cellules-MEC constituent un prérequis indispensable à la dissémination métastatique (Martin and Jiang, 2009). La perte de ces interactions permet à certaines cellules de se dissocier de la masse tumorale et d'envahir le stroma tumoral. L'invasion nécessite également la dégradation du stroma péri-tumoral. Ce processus complexe met en jeu des molécules d'adhésion telles que les cadhérines, les intégrines, mais également des protéases qui possèdent la capacité de dégrader la MEC (Bussemakers and Schalken, 1996).

L'adhésion entre cellules épithéliales (et donc tumorales) ou entre cellules endothéliales fait intervenir des jonctions serrées ou tight junctions, des jonctions adhérentes ou encore des desmosomes (figure 17) (Zhou et al., 2017 ; Knights et al., 2013). Ces molécules d'adhésion constituent des barrières que les cellules tumorales doivent surpasser afin de pouvoir quitter le foyer initial. Ainsi, des changements d'interaction entre cellules tumorales mais aussi entre les cellules endothéliales sont indispensables au processus (Cavallaro and Christofori, 2001 ; Martin and Jiang, 2009). Dans le cancer du sein, une diminution de l'expression de la E-cadhérine, constituant clé des jonctions adhérentes, est corrélée à l'invasion tumorale et à la dissémination métastatique (Oka et al., 1993 ; Berx and Roy, 2001 ; Heimann et al., 2000). L'absence d'expression de la E-cadhérine chez des

patientes avec un cancer du sein est associée à un mauvais pronostic (Kashiwagi et al., 2011 ; Berx and Roy, 2001). Parallèlement à la diminution des jonctions serrées et adhérentes, on note une diminution de l'expression des protéines formant les desmosomes, ce qui favorise la progression tumorale et l'invasion précoce des cellules tumorales (Dusek and Attardi, 2011).

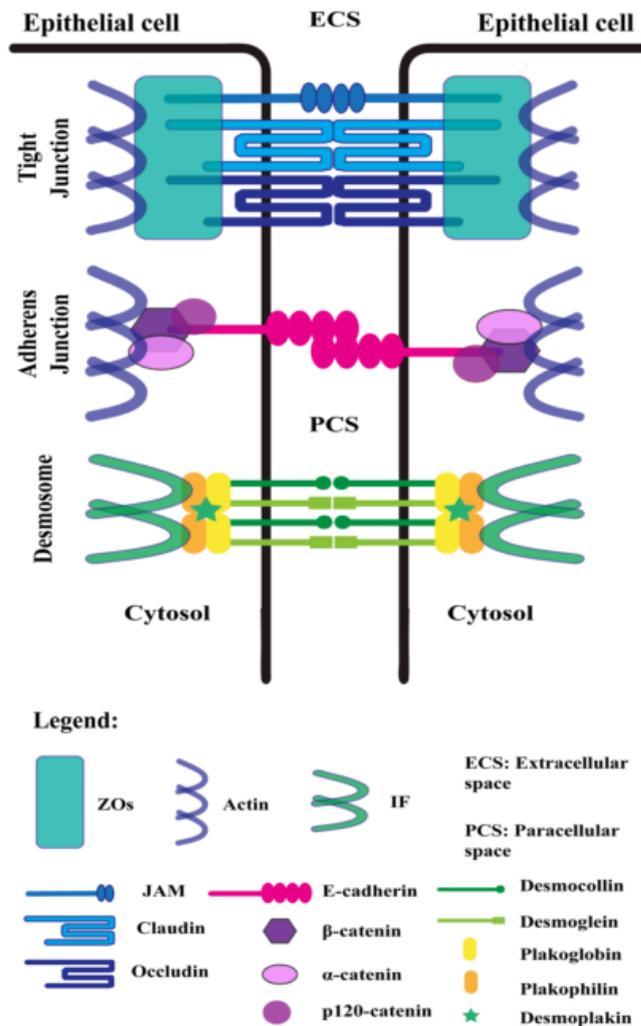


Figure 17. Adhésion cellulaire latérale des cellules épithéliales.

Composants moléculaires des jonctions serrées (tight junctions), jonctions adhérentes (adherens junctions) et des desmosomes. ZO : protéines de la zona occludens ; IF : Filaments intermédiaires ; JAM : Junctional adhesion molecule (molécule d'adhésion des jonctions serrées) (Knights et al., 2013).

De manière concomitante à la modulation des interactions entre cellules tumorales, celle de l'interaction entre les cellules tumorales et les constituants de la MEC est également au cœur de ce processus. Différents partenaires ont été identifiés parmi lesquels des molécules d'adhésion : intégrines, sélectines, cadhérines ou encore CD44. La MEC représente un vaste réseau de glycoprotéines et protéoglycanes (collagène, laminine) et soutient les couches de cellules tumorales. Elle joue un rôle majeur dans la progression tumorale (Lu, Weaver, and

Werb, 2012). Lors des phases initiales du développement tumoral, la densité de sa structure constitue une barrière à la dissémination métastatique. Cependant, au cours de la progression tumorale et sous l'effet de protéases (MMP et de collagénases) sécrétées par les cellules tumorales ou avoisinantes, l'intégrité de ce réseau est perturbée (Stamenkovic, 2003).

Les MMP jouent un rôle clé dans la progression tumorale et interviennent non seulement dans la dégradation de la MEC mais aussi dans le relargage de facteurs de croissance (Overall and Kleinfeld, 2006). Elles participent à l'angiogenèse à travers la solubilisation du VEGF et le recrutement de cellules endothéliales progénitrices (Ito et al., 2009). Le clivage de la E-cadhérine par les MMP-7 et 9 va favoriser le passage vers la transition épithélium-mésenchyme et donc l'acquisition d'un phénotype migratoire (Lee et al., 2007).

➤ Invasion tumorale et transition épithélium-mésenchyme

Comme les modulations d'interactions cellulaires, un autre facteur majeur façonnant le caractère métastatique d'une cellule est la transition épithélio-mésenchymateuse ou TEM (Kalluri and Weinberg, 2009). En effet, l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux par les cellules tumorales est étroitement corrélée à l'invasion tumorale et à la dissémination métastatique, et elle est associée à une survie réduite, notamment dans le cancer du sein (Trimboli et al., 2008 ; Wang and Zhou, 2011). Elle correspond à un processus de transdifférenciation cellulaire permettant d'engendrer des cellules au phénotype mésenchymateux à partir de cellules épithéliales. Cette transition se traduit par une perte de jonctions intercellulaires, une dépolarisation des cellules épithéliales, et ensuite par l'acquisition de capacités de migration cellulaire (Lamouille, Xu, and Derynck, 2014). Ce processus est contrôlé par des signaux du micro-environnement et orchestré par des facteurs de transcription, dont les mieux caractérisés appartiennent aux familles de Twist, Snail et Zeb (figure 18) (Batlle et al., 2000 ; Takkunen et al., 2006). Différents phénomènes sont à l'origine de cette activation. La compression mécanique, engendrée par la prolifération anarchique des cellules tumorales ainsi que l'hypoxie intra-tumorale induisent l'expression de Twist (Yang and Wu, 2008). De plus, le micro-environnement tumoral et notamment les

cytokines pro-inflammatoires sont capables d'induire l'expression de ces différents facteurs de transcription (Leibovich-Rivkin et al., 2013). Ils répriment l'expression de la E-cadhérine et de l' α -caténine, facteurs clés de l'adhésion cellule-cellule comme nous l'avons évoqué précédemment (Batlle et al., 2000). De plus, ils induisent l'expression des gènes de la N-cadhérine ou encore de la vimentine, marqueurs caractéristiques du phénotype mésenchymateux (Kokkinos et al., 2007 ; Grünert, Jechlinger, and Beug, 2003). La TEM permet aux cellules tumorales d'acquérir la plasticité nécessaire à l'invasion, l'intravasation et l'implantation au sein du site secondaire. De plus, la TEM est étroitement liée à la production de MMP. Les facteurs Snail et Slug sont notamment responsables de la production de MMP-2 et MMP-9, facteurs clés de l'invasion des tumeurs du sein (Jeziarska and Motyl, 2009 ; Wang et al., 2011).

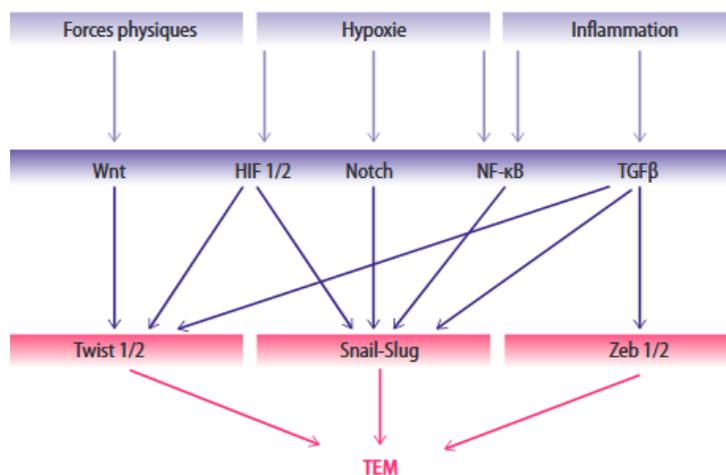


Figure 18. Activation des gènes clés de la TEM au cours de la tumorigénèse. La compression mécanique, l'hypoxie et l'inflammation entraînent l'expression de gènes clés de la TEM : Twist, Snail ou encore Zeb (Puisieux and Caramel, 2013).

➤ Intravasation et circulation sanguine

L'entrée des cellules tumorales dans la lumière des vaisseaux est l'étape suivante. Elle est définie comme l'**intravasation**. Tous les mécanismes de ce processus ne sont aujourd'hui pas élucidés. Des milliers de cellules peuvent entrer dans la circulation sanguine, mais très peu formeront des métastases (Butler and Gullino, 1975). Les cellules tumorales circulantes ou CTC sont confrontées à un stress mécanique mais également environnemental particulièrement important.

Une explication à ce phénomène réside dans l'activité du système immunitaire qui peut éliminer des cellules tumorales circulantes (Mego, Mani, and Cristofanilli, 2010). De plus, la perte d'interaction avec la MEC peut conduire à un programme de mort cellulaire, connu sous le nom d'anoïkis (Paoli, Giannoni, and Chiarugi, 2013 ; Guo and Giancotti, 2004).

Au cours de leur transit, les cellules tumorales tirent profit de l'interaction avec des éléments figurés du sang. Les cellules cancéreuses se lient en effet aux plaquettes (figure 19) (Läubli and Borsig, 2010). Cette interaction est dépendante des P-sélectines (Lou et al., 2015). Des micro-agrégats se forment rapidement après l'intravasation et les cellules tumorales sont capables d'induire l'activation des plaquettes (Gil-Bernabé, Lucotti, and Muschel, 2013). Les modèles pré-cliniques d'étude de l'interaction cellules tumorales-plaquettes ont permis de montrer qu'une inhibition pharmacologique de cette interaction diminue l'incidence de la formation des tumeurs secondaires, soulignant le rôle primordial de cette interaction dans la colonisation métastatique (Borsig et al., 2002). Les cellules tumorales peuvent également résister au stress mécanique de manière indépendante à leur interaction avec les plaquettes. A titre d'exemple, les cellules métastatiques du sein co-expriment une version tronquée de la Pannexin-1 avec sa forme entière, conduisant à un relargage d'ATP, qui va agir de manière autocrine sur le récepteur P2Y des cellules tumorales. Ceci induit une cascade de signalisation aboutissant à une inhibition de l'apoptose, protégeant ainsi les cellules tumorales de la mort cellulaire (figure 19) (Furrow et al., 2015).

Au cours de leur trajet dans la circulation sanguine, les cellules tumorales doivent également résister à l'anoïkis. Si les différents mécanismes de résistance à l'anoïkis ne sont pas tous élucidés, il semblerait que les cellules métastatiques présentent une altération des mécanismes impliqués dans la cascade apoptotique (Mehlen and Puisieux, 2006 ; Paoli, Giannoni, and Chiarugi, 2013). Un facteur de transcription particulier (ZNF304) active notamment la voie β 1-intégrine et des complexes d'ancrage, permettant le maintien du signal de survie classiquement engendré par ces complexes (Aslan et al., 2015). D'autres mécanismes impliquant des dérégulations des voies de prolifération ont été décrits. Les cellules tumorales

présentes dans la circulation sont exposées à une grande quantité de cellules immunitaires circulantes et notamment les Natural Killers (NK) qui sont impliqués dans la vigilance anti-tumorale (Strilic and Offermanns, 2017). Certaines tumeurs sécrètent des ligands (MICA, MICB) des cellules NK, ce qui entrave l'activité anti-tumorale de ces dernières (Chitadze et al., 2013). D'autres mécanismes d'échappement tumoral ont été décrits comme la sécrétion par les cellules tumorales de molécules modulant l'activité du système immunitaire (Morvan and Lanier, 2016). L'interaction avec les plaquettes est également impliquée dans ce phénomène à travers le masquage des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe I (Labelle and Hynes, 2012).

De plus, des molécules d'adhésion comme VCAM-1 jouent un rôle majeur dans la survie des cellules tumorales à travers le recrutement des macrophages, dont la présence est indispensable à leur survie.

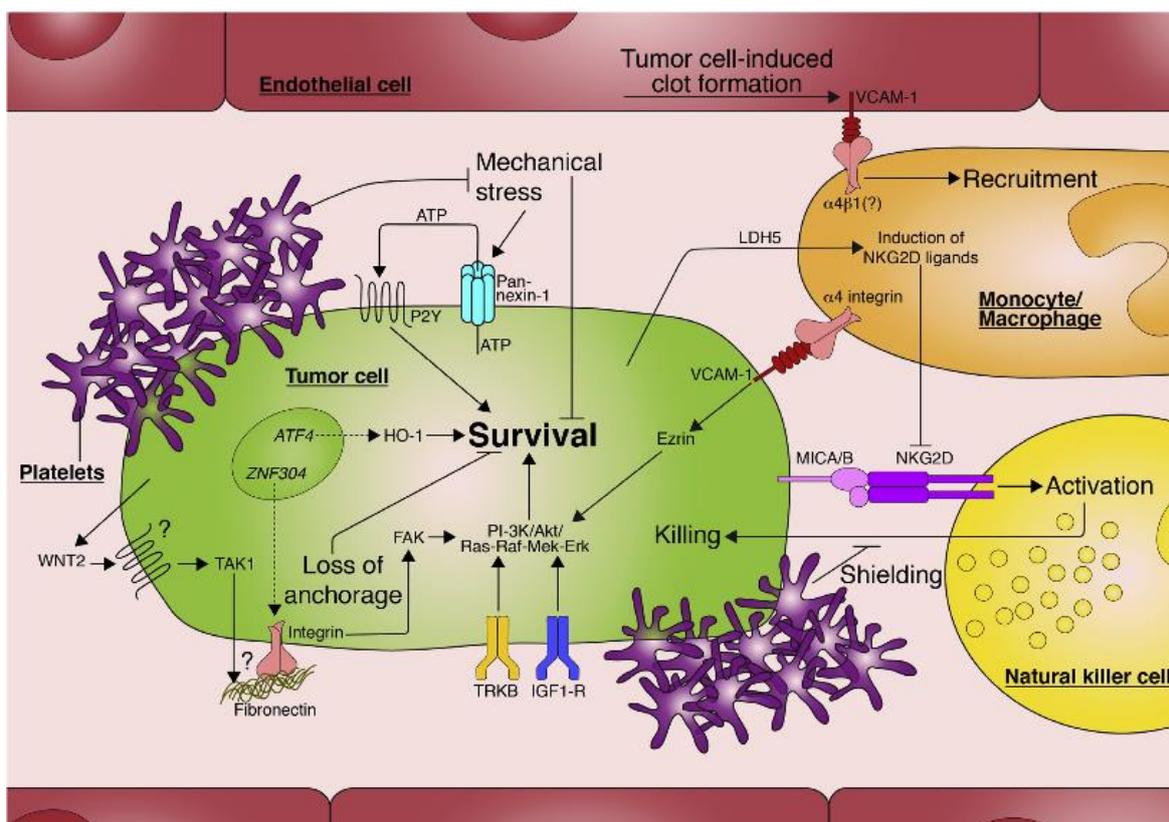


Figure 19. Mécanismes de survie cellulaire dans la circulation sanguine. Plusieurs processus sont impliqués dans la survie des cellules tumorales dans la circulation sanguine : la résistance à l'anoïkis, le stress mécanique, ainsi que l'échappement vis-à-vis de la vigilance du système immunitaire. (Strilic and Offermanns, 2017).

➤ Extravasation des cellules tumorales

L'extravasation nécessite une adhésion des cellules tumorales à l'endothélium et leur migration à travers celui-ci. Le mode principal d'extravasation est le mode para-cellulaire où les cellules tumorales migrent entre les cellules endothéliales. Ce processus nécessite d'importants réarrangements du cytosquelette et des jonctions cellulaires (Strilic and Offermanns, 2017). Cette adhésion hétérotypique entre cellules tumorales et cellules endothéliales met en jeu des intégrines, cadhérines, sélectines et autres molécules d'adhésion. **Les cellules tumorales peuvent directement promouvoir leur extravasation.** Par exemple, les cellules tumorales du cancer du sein peuvent sécréter une protéine, ANGPTL4, qui détruit les jonctions entre les cellules endothéliales (Padua et al., 2008 ; Huang et al., 2011). Elles peuvent également sécréter la protéine SPARC qui, en se liant à la molécule d'adhésion VCAM-1 présente à la surface des cellules endothéliales, va entraîner un remodelage du cytosquelette d'actine et par conséquent l'ouverture des jonctions endothéliales (figure 20) (Tichet et al., 2015). Les cellules tumorales peuvent également induire la mort des cellules endothéliales par nécrose (Strilic et al., 2016).

Parallèlement à ces phénomènes d'interaction directe entre les cellules tumorales et l'endothélium, l'extravasation nécessite également la présence des cellules immunitaires et des plaquettes. **Les cellules myéloïdes** supportent notamment l'extravasation (Coupland, Chong and Parish, 2012 ; Stegner, Dütting and Nieswandt, 2014). **Les plaquettes** peuvent relarguer du TGF- β induisant une cascade de signalisation intracellulaire nécessaire à la transmigration, mais aussi de l'ATP modulant les jonctions endothéliales (figure 20) (Takemoto et al., 2017 ; Schumacher et al., 2013). Elles peuvent également recruter des neutrophiles par l'intermédiaire de chimiokines. Elles peuvent interagir directement avec les cellules tumorales et faciliter leur extravasation (Strilic and Offermanns, 2017). Les cellules tumorales peuvent également participer au recrutement de monocytes par chimiotactisme. Ces monocytes, en activant ensuite l'endothélium, supportent la transmigration des cellules tumorales (Häuselmann et al., 2016). Ils peuvent aussi passer dans le tissu et se différencier en macrophages (Metastasis-

associated-macrophages). Ces macrophages vont médier l'infiltration des cellules tumorales en sécrétant du VEGF qui augmente la perméabilité vasculaire (Qian et al., 2011).

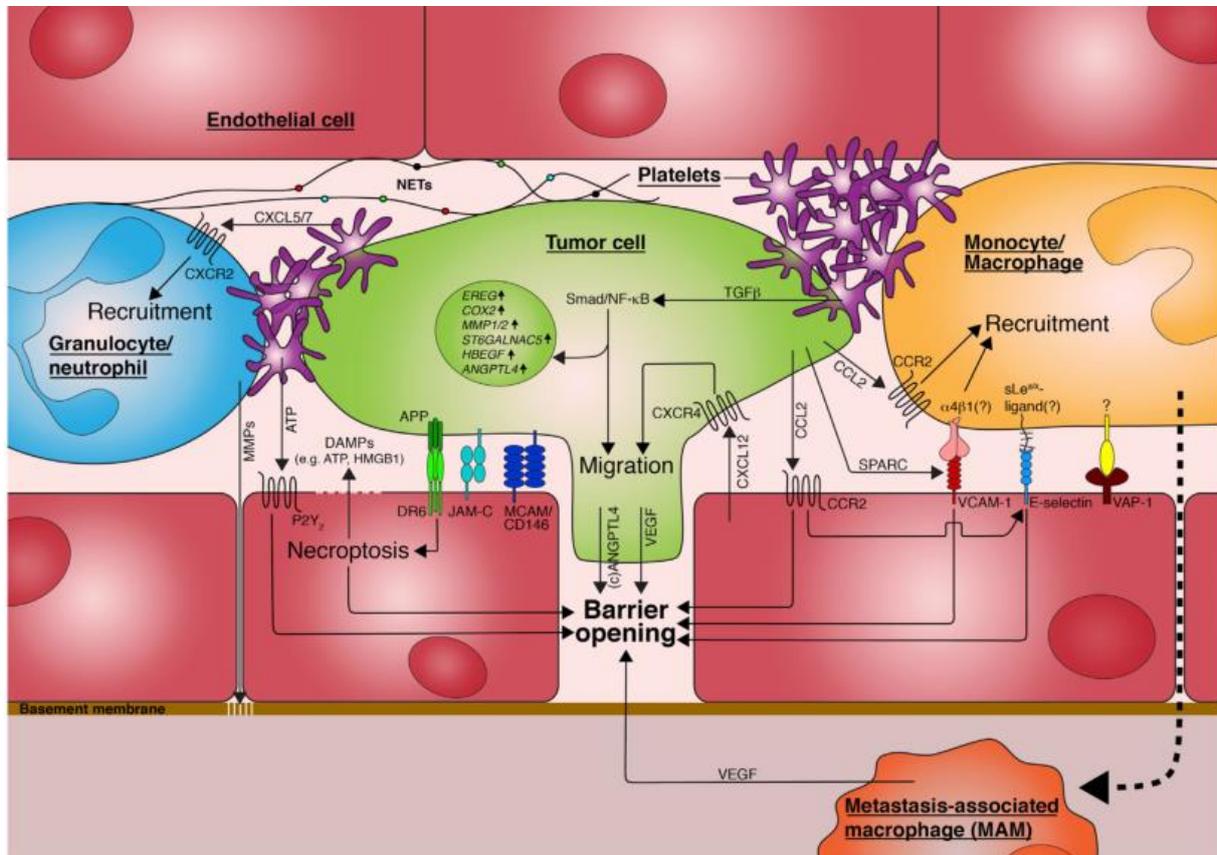


Figure 20. Mécanisme d'extravasation tumorale. L'extravasation nécessite la présence de différents acteurs : les cellules tumorales, les cellules immunitaires, les plaquettes et les cellules endothéliales. Les cellules tumorales peuvent directement promouvoir l'extravasation ou interagir avec ces types cellulaires. (Strlic and Offermann, 2017).

➤ [La transition mésenchyme-épithélium](#)

Si la transition épithélium-mésenchyme (TEM) favorise les étapes initiales de la dissémination métastatique, les étapes tardives semblent nécessiter une transition inverse. En effet, l'extravasation et la colonisation d'un tissu secondaire seraient en partie dépendantes de la transition mésenchyme-épithélium (TME). Il s'agit, comme pour la TEM, d'un processus dynamique contrôlé par divers facteurs protéiques (Moyret-Lalle et al., 2016). La cascade métastatique semble ainsi reposer sur la plasticité des cellules cancéreuses et leur capacité à réaliser ces transitions.

➤ La dormance métastatique responsable de la maladie résiduelle ?

La plupart des cellules tumorales qui ont réalisé l'extravasation ne sont pas capables de coloniser le nouvel environnement efficacement. Les métastases peuvent rester des mois voire des années à l'état quiescent, de dormance, dans un tissu secondaire. Ce sont des micro-métastases (Wikman, Vessella, and Pantel, 2008). Ces micro-métastases constituent une maladie résiduelle qui est caractérisée par la persistance de cellules tumorales dans l'organisme, non détectables par les techniques conventionnelles de diagnostic. Ces cellules ne présentent d'une part pas les caractéristiques histologiques et moléculaires des cellules transformées, et sont d'autre part dans un état de dormance. Ce sont des cellules qui réussissent à survivre dans l'organisme même après une thérapie anticancéreuse et qui demeurent inactives pendant des mois, voire des années (Gomis and Gawrzak, 2017).

Tous les mécanismes aboutissant aux phénomènes de dormance métastatique restent encore très mal connus, en raison de la difficulté d'isolation des cellules dormantes. La transition vers des macro-métastases, cliniquement identifiables, semble néanmoins coïncider avec l'expansion de rares clones aux profils génétiques et cytogénétiques particuliers (Klein et al., 2002). Trois mécanismes moléculaires caractérisent la dormance tumorale : l'arrêt mitotique et donc la quiescence cellulaire, la dormance angiogénique et la dormance immunologique (Almog, 2010).

Ces cellules en dormance sont caractérisées par une prolifération limitée, une absence de marquage Ki-67 et de marqueurs apoptotiques (Pantel, Brakenhoff, and Brandt, 2008 ; Aguirre-Ghiso, 2007). On retrouve dans ce sens, une activité réduite de la voie PI3K-Akt à l'origine de la quiescence cellulaire (Grabinski et al., 2011). Cette quiescence métastatique peut être l'une des raisons pour lesquelles la chimiothérapie ne conduit pas à l'élimination des cellules tumorales (Pantel and Brakenhoff, 2004). De plus, l'incapacité de ces cellules isolées à induire l'angiogenèse au sein du nouveau site s'affiche comme une étape limitante à la croissance de ces micro-métastases et à leur élimination par les thérapies

conventionnelles (Chambers, Groom and MacDonald, 2002). Les cellules dormantes acquièrent également un profil antigénique particulier leur permettant d'échapper à la vigilance du système immunitaire (Koebel et al., 2007). Les mécanismes régulateurs de la dormance restent encore à ce jour très mal caractérisés, aucun marqueur ne permet de différencier les cellules qui resteront micro-métastatiques de celles qui vont évoluer vers des macro-métastases.

3.4 Profil de dissémination métastatique

La distribution des métastases dans l'organisme ne s'effectue pas aléatoirement. Plusieurs théories se sont succédées pour expliquer pourquoi et comment une cellule métastase. En 1889, Stephen Paget introduisait la **théorie « seed and soil »** ou « de la graine et du sol », selon laquelle les métastases ne se distribuent pas au hasard dans un organisme. A partir d'observations basées sur le cancer du sein, Paget a en effet proposé une théorie selon laquelle l'implantation métastatique dépend du phénotype de la métastase (la graine) et de la présence d'un substrat propice (le sol) au niveau d'organes secondaires particuliers (figure 21) (Langley and Fidler, 2011). Les caractéristiques intrinsèques aux cellules tumorales et le micro-environnement ont pour effet de diriger les cellules métastatiques vers un site précis. Les médiateurs des colonisations secondaires sont alors différents selon l'organe impliqué. Ainsi, deux tumeurs différentes peuvent métastaser au sein du même site et deux tumeurs identiques peuvent présenter des sites de dissémination différents. Cette théorie s'oppose à celle d'Ewing établie en 1928 qui postule que les métastases colonisent en premier lieu les organes fortement vascularisés.

Quelles cellules peuvent métastaser ? Deux théories ont été proposées. La plus classique repose sur la **sélection clonale** qui indique que les cellules au potentiel métastatique sont « clonées » tout au long de la progression tumorale. Cette dernière est en contradiction avec la théorie de la **signature métastatique**, selon laquelle il existerait un profil d'expression génétique métastatique. Celle-ci se heurte donc à la théorie de l'évolution clonale où la compétence ne s'acquiert que

tardivement (Méjean and Leuret, 2008). Toutes ces théories pourraient néanmoins coexister (Nguyen and Massagué, 2007). Ainsi, il est clair que toutes les cellules tumorales ne métastasent pas : il existe dans la tumeur une hétérogénéité marquée. Certaines populations de cellules pourraient alors exprimer des gènes « métastatiques », mais cependant elles ne métastaseront que si le tissu hôte leur fournit les signaux manquants à leur implantation et leur croissance.

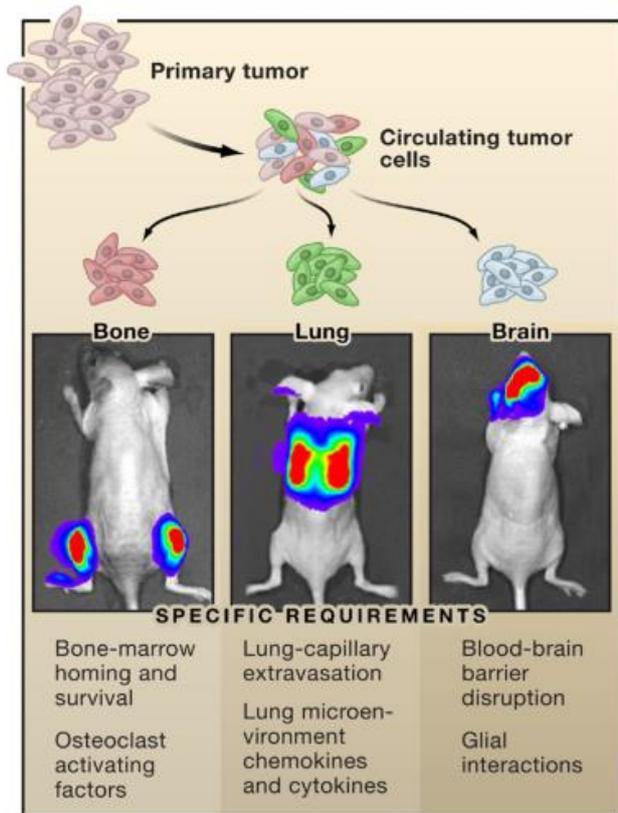


Figure 21. Profil de distribution des cellules métastatiques. Il dépend de propriétés intrinsèques aux cellules tumorales mais également de caractéristiques du site de dissémination secondaire (Gupta and Massagué, 2016).

Ici sont présentées quelques généralités de la dissémination dans le tissu osseux, hépatique et pulmonaire, sites préférentiels de développement des métastases des cancers du sein.

➤ [Colonisation osseuse](#)

La colonisation du tissu osseux est un exemple typique de coopération entre cellules tumorales et microenvironnement. Elle est en effet fortement dépendante des interactions entre les cellules tumorales et les cellules du tissu osseux, ostéoblastes et ostéoclastes notamment (figure 22). Les cellules tumorales, une fois dans le tissu osseux, mettent en place les mêmes mécanismes que ceux impliqués

dans le remodelage du tissu osseux. Les cellules tumorales du sein peuvent ainsi sécréter des facteurs inhibant l'action des ostéoblastes (cellules impliquées dans la formation de l'os) et favorisant celles des ostéoclastes (cellules impliquées dans la dégradation de l'os), comme les cytokines IL-8 et IL-14 (Gupta and Massagué, 2006). De plus, les cellules tumorales peuvent sécréter des protéases clivant le récepteur RANKL, à l'origine de l'activation des ostéoclastes. Ainsi, les cellules tumorales détournent à leur profit l'activité de ces cellules présentes dans le tissu. Il se produit un véritable « cercle vicieux » entre cellule tumorale et environnement : la cellule tumorale produit des facteurs stimulant la résorption osseuse. Celle-ci permet la libération de facteurs de croissance stimulant à leur tour la croissance des cellules tumorales. Parmi les gènes nécessaires à cette colonisation osseuse, CXCR4, l'ostéopontine (OPN), les MMP-1 et IL-11 ont notamment été identifiés (Gupta and Massagué, 2006).

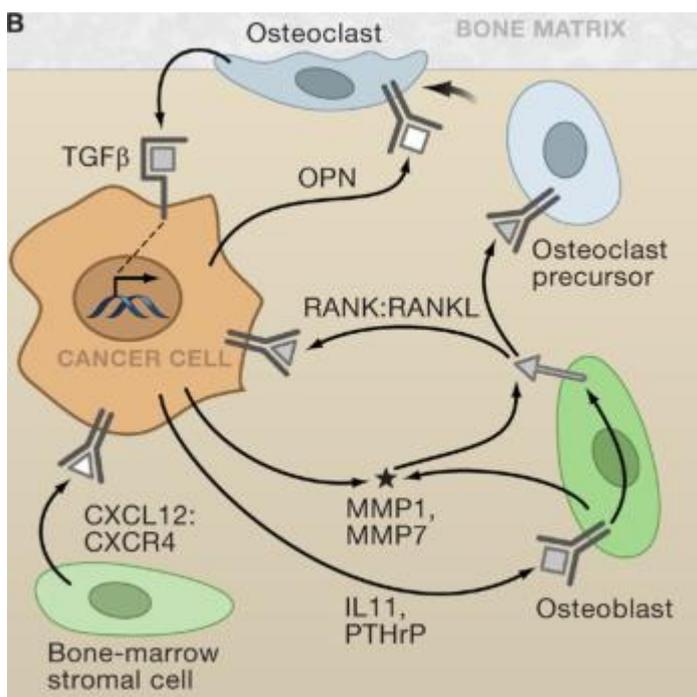


Figure 22. Représentation schématique et partielle des acteurs intervenant dans la colonisation métastatique osseuse (Gupta and Massagué, 2016).

➤ Colonisation pulmonaire

Récemment, l'analyse des gènes impliqués dans le processus métastatique des cancers du sein a conduit à l'identification de gènes dits « à signature métastatique pulmonaire ». Il s'agit de gènes codant pour des facteurs sécrétés

comme SPARC, des récepteurs de surface comme VCAM-1, de protéases (MMP-1 et MMP-2) ou encore des effecteurs intracellulaires (COX-2) (Minn et al., 2005).

➤ Colonisation hépatique

Si l'importante vascularisation du foie sous-tend son implication dans la maladie métastatique, des facteurs intrinsèques aux cellules tumorales ont des rôles prépondérants dans la colonisation hépatique. Des chimiokines, et notamment l'axe CXCR4/CXCL12, s'imposent comme des éléments clés de ces mécanismes (Andre et al., 2006 ; Müller et al., 2001). De plus, la surexpression de molécules d'adhésion (EpCAM, CD44, N-cadhérine) ainsi que le micro-environnement hépatique constituent tous deux des acteurs clés de la colonisation du foie (Ma et al., 2015).

➤ La dissémination métastatique, un évènement précoce de la progression tumorale ?

S'il est très largement admis que la formation de métastases à distance est un évènement tardif de la progression tumorale, plusieurs études ont suggéré une occurrence plus précoce de la dissémination métastatique. La première mise en évidence de ce phénomène provient de l'analyse des cellules disséminées isolées à partir de la moelle osseuse de patientes atteintes d'un cancer du sein non métastatique (Klein et al., 2002 ; Schmidt-Kittler et al., 2003). Cette présence de cellules isolées dans la moelle augmente par ailleurs le risque de rechute à distance (Braun et al., 2000). Avec l'utilisation de souris transgéniques développant des tumeurs du sein spontanées, il a pu être démontré une présence de cellules tumorales dans la moelle osseuse et dans les poumons respectivement dès 4 et 9 semaines alors que la tumeur primaire devient invasive seulement après 23 semaines (Hüsemann et al., 2008). Une observation similaire a récemment été constatée dans des modèles pré-cliniques de cancer du pancréas et de mélanome (Eyles et al., 2010 ; Rhim et al., 2012). Les données acquises chez des patientes avec des lésions du sein pré-cancéreuses ou des carcinomes *in situ* corroborent par ailleurs ces données (Sänger et al., 2011 ; Banyas et al., 2012 ; Hüsemann et al., 2008).

4. Diagnostic et prise en charge thérapeutique du cancer du sein

4.1 Bilan diagnostic initial du cancer du sein

Lorsqu'une patiente présente des symptômes ou qu'une anomalie est détectée lors d'un examen de dépistage, différents examens sont nécessaires afin d'établir un diagnostic. Le bilan initial devant une suspicion de cancer du sein prévoit une mammographie systématique, qui correspond à une radiographie à rayons X des seins. Si cet examen permet de détecter une anomalie éventuelle, il ne permet pas de déterminer avec certitude la présence ou non d'une tumeur maligne. Il peut être complété par deux autres examens d'imagerie, l'échographie et plus rarement l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Ce n'est qu'à l'issue d'une biopsie que le diagnostic histologique du cancer peut être posé.

Le type et le grade histologiques sont déterminés à partir de l'échantillon prélevé. Cet examen permet alors de déterminer s'il s'agit d'une lésion bénigne, d'un carcinome *in situ* et donc sans lésion infiltrante, ou d'un carcinome infiltrant, le type (canalaire *vs* infiltrant) ainsi que le grade histologique (grade SBR). De plus, le statut des récepteurs hormonaux ainsi que le statut HER2 constituant des facteurs pronostiques et/ou prédictifs sont également évalués.

➤ Bilan d'extension du cancer du sein

Une fois le diagnostic de cancer du sein avéré, la prise en charge thérapeutique dépend des résultats de l'examen anatomopathologique mais aussi du bilan d'extension loco-régional (atteinte ganglionnaire) et métastatique. La colonisation ganglionnaire est évaluée lors de l'exérèse de la tumeur primaire par la méthode du ganglion sentinelle ou curage axillaire.

Des métastases à distance sont systématiquement recherchées pour les cancers infiltrants de taille supérieure à 1 cm. Au minimum, des radiographies pulmonaires et une échographie abdomino-pelvienne sont réalisées. Pour les tumeurs supérieures à 3 cm, de grade II ou III, les tumeurs avec adénopathies, un examen tomodensitométrique (TDM, scanner à rayons X) thoracique et abdominal, et une scintigraphie osseuse peuvent être réalisés. Le bilan d'extension permet

donc de préciser le stade de développement tumoral et de recueillir les facteurs prédictifs de réponse aux traitements. C'est grâce à ces divers examens que le clinicien peut établir la classification TNM et ainsi élaborer une stratégie thérapeutique.

➤ Apport de la Tomographie par Emission de Positron (TEP) dans le bilan d'extension du cancer du sein

Dans le cadre de l'établissement du bilan d'extension la TEP au ^{18}F -FDG permet en un unique examen la recherche de colonisation ganglionnaire et de métastases à distance (Groheux et al., 2008 ; Koolen et al., 2012). L'intensité de fixation du ^{18}F -FDG dans les cancers du sein est corrélée aux facteurs histobiologiques d'agressivité tumorale (indice mitotique élevé, phénotype TN, index Ki-67 élevé) (Dogan and Turnbull, 2012 ; Buck et al., 2002). Cet examen fournit une information pronostique, les tumeurs fixant peu le traceur étant associées à un pronostic favorable (Baba et al., 2014 ; Inoue et al., 2004). Cependant, à ce jour, les performances de la TEP sont insuffisantes pour le diagnostic de malignité d'une lésion mammaire et elle ne peut se substituer à la biopsie. Dans le cadre du bilan d'extension, cet examen est désormais recommandé pour des tumeurs mammaires cliniquement de stade IIb ou supérieur. De plus, la TEP au ^{18}F -FDG s'est imposée aujourd'hui comme un examen clé du bilan d'extension pré-thérapeutique et de la détection précoce de la récurrence tumorale. Elle permet également le suivi de l'activité métabolique de la tumeur au cours de la thérapie.

4.2 Prise en charge thérapeutique du cancer du sein

Le traitement du cancer du sein repose souvent sur une stratégie associant plusieurs traitements. Cette stratégie est décidée en fonction du stade de la tumeur, de l'âge de la patiente, de son état général, du bilan d'extension de la maladie et de facteurs histo-pronostiques de la tumeur (taille, grade, atteinte ganglionnaire, extension métastatique et récepteurs hormonaux et HER2). La classification moléculaire a été à l'origine de la mise en place d'une médecine personnalisée, en adaptant le traitement au profil d'expression des marqueurs ER, PR et HER2 de la tumeur primaire. Différents types de traitements ont ainsi été développés dans le but de traiter ces cancers le plus efficacement possible : la

chirurgie, la radiothérapie, les thérapies ciblées (hormonothérapie et anti-HER2), ainsi que la chimiothérapie. Ces traitements sont cruciaux pour ralentir ou supprimer les lésions cancéreuses, réduire le risque de récurrence mais aussi pour traiter les symptômes de la maladie. Les différents traitements proposés selon le stade du cancer sont indiqués dans la figure 24.

➤ Chirurgie

La chirurgie est une technique efficace pour retirer la tumeur primaire. Elle est particulièrement bénéfique quand la tumeur est de petite taille et peu invasive et donc diagnostiquée à l'état non-métastatique. La chirurgie peut être de deux types : la tumorectomie, chirurgie mammaire conservatrice ou la mastectomie non conservatrice, consistant en l'ablation totale du sein.

Cette chirurgie peut être précédée d'une chimiothérapie néo-adjuvante afin de réduire la masse tumorale avant son exérèse. Elle correspond à l'utilisation d'un traitement cytotoxique systémique avant le traitement chirurgical. Dans le cancer du sein, elle a initialement été utilisée dans les formes localement avancées non opérables. Cette forme de chimiothérapie a ensuite été proposée dès la fin des années 80 pour les tumeurs non métastatiques ou avec envahissement ganglionnaire (Lee and Newman, 2007). Une chimiothérapie adjuvante peut être administrée après exérèse de la masse tumorale selon le stade du cancer et du risque de récurrence (Chew, 2001).

L'exérèse du ganglion sentinelle peut être proposée en cas de carcinome infiltrant et de petite taille. Cette technique consiste à repérer le ou les premier(s) ganglion(s) recevant le drainage lymphatique axillaire du sein (ganglion sentinelle) et à en faire l'exérèse (figure 23). L'analyse par l'anatomopathologiste permet de vérifier la présence ou non de cellules cancéreuses dans les ganglions. Elle permet alors de préciser si la tumeur s'étend au-delà du sein et de déterminer si un traitement complémentaire est nécessaire. Si le ganglion sentinelle contient des cellules tumorales, un curage axillaire consistant au retrait d'un ensemble de ganglions lymphatiques est réalisé. Le but du curage ganglionnaire consiste non seulement au retrait des cellules tumorales mais aussi en la réduction du risque de récurrence.

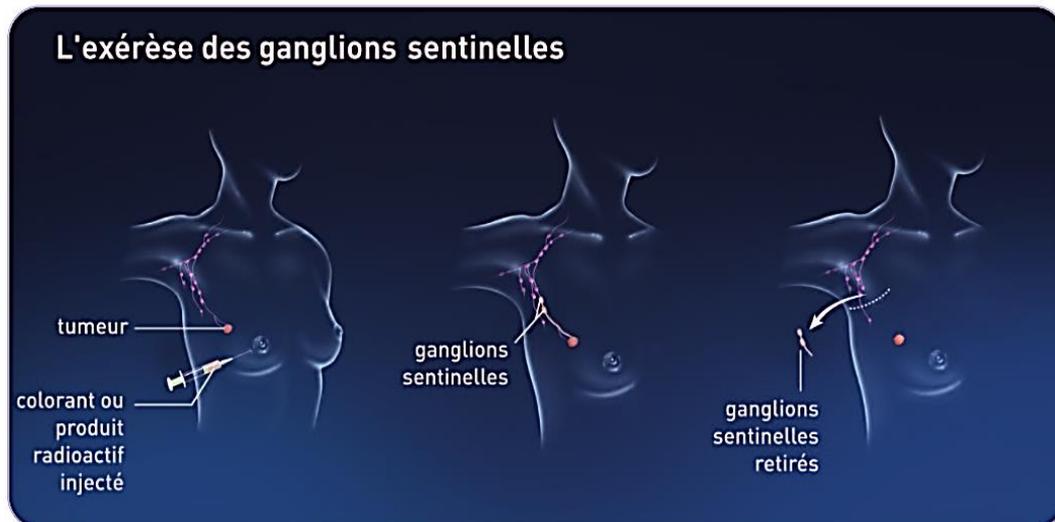


Figure 23. Exérèse du ganglion sentinelle. Un colorant bleu ou un isotope radioactif, permettant de repérer le ganglion sentinelle, est injecté au voisinage de la tumeur. Il est alors retiré et l'examen anatomopathologique est réalisé (Tiré de <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-sein/Chirurgie-tumorectomie-et-mastectomie/Exerese-du-ganglion-sentinelle>, Institut National du cancer).

Toutes les pièces chirurgicales sont analysées et le statut des récepteurs hormonaux et le statut HER2 sont déterminés. Ce sont des facteurs prédictifs du traitement. C'est à partir de ces résultats que les cliniciens peuvent décider d'un traitement complémentaire à la chirurgie.

➤ Radiothérapie externe

La radiothérapie externe utilise des rayonnements ionisants, les rayons X. Elle est souvent administrée en complément de la résection tumorale. Elle consiste à diriger les rayonnements sur la zone à traiter tout en préservant les tissus sains du mieux possible. Les indications de cette radiothérapie varient en fonction du stade du cancer : elle peut être utilisée dans les cancers *in situ* et infiltrants en complément de la chirurgie. Après une tumorectomie, une irradiation locale de la glande mammaire est indiquée. En cas de facteur de risque de récurrence (âge inférieur à 60 ans, grade histologique élevé) une dose additionnelle est délivrée dans le lit tumoral. La radiothérapie externe peut également être utilisée dans le but de traiter les métastases cérébrales ou osseuses. Une irradiation de la paroi thoracique peut être indiquée selon les facteurs pronostiques associés aux tumeurs infiltrantes (statut ganglionnaire, âge, grade histologique).

➤ Chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement reposant sur l'administration de médicaments qui agissent sur les cellules tumorales en les détruisant ou en inhibant leur multiplication. Elle réduit le risque de récurrence tumorale et améliore les chances de guérison des patientes. Comme rappelé plus haut, elle peut avoir lieu avant ou après la chirurgie en cas de carcinome infiltrant. Cette thérapie est particulièrement utilisée dans le traitement du cancer du sein triple négatif pour lequel aucune thérapie ciblée n'est actuellement disponible. Du fait de leur index mitotique élevé, ces tumeurs sont les plus chimiosensibles (Liedtke et al., 2008 ; Carey et al., 2007). De nombreux agents chimiothérapeutiques sont utilisés dans le cas de cancers infiltrants ou métastatiques. Il s'agit majoritairement d'agents de la famille des anthracyclines ou des taxanes (Bines et al., 2014). La chimiothérapie seule ou en combinaison avec les thérapies ciblées (anti-HER2) ou les hormonothérapies (anti-œstrogènes) constitue le traitement de référence pour les stades métastatiques.

➤ Hormonothérapie

L'hormonothérapie est utilisée pour la prise en charge des tumeurs hormonosensibles, c'est-à-dire exprimant les récepteurs aux œstrogènes (ER) ou à la progestérone (PR). 80 % des cancers du sein sont hormonosensibles, et c'est l'examen anatomopathologique qui détermine l'expression de ces récepteurs et permet d'adapter le traitement selon ce profil d'expression. La liaison de l'hormone à son récepteur déclenche une voie de signalisation régulant la croissance des cellules tumorales. L'objectif de l'hormonothérapie réside en la suppression de la production des hormones féminines par l'organisme ou le blocage de leur fixation sur les cellules tumorales. En cas de cancer infiltrant localisé et hormonosensible, l'hormonothérapie peut être proposée en complément de la chirurgie. On parle d'hormonothérapie adjuvante, son objectif étant de réduire le risque de récurrence locale et de rechute à distance. Dans le cas d'un cancer métastatique diagnostiqué hormonosensible, ce traitement peut être prescrit en association avec des agents de chimiothérapie. Parmi les hormonothérapies, on distingue le tamoxifène (inhibiteur compétitif des récepteurs aux œstrogènes), les inhibiteurs de

l'aromatase (inhibition de la synthèse des œstrogènes) ou la suppression de la synthèse des œstrogènes (chirurgie, irradiation).

➤ Thérapies ciblées

Les thérapies ciblées ont pour objectif de cibler spécifiquement les cellules tumorales. En agissant de manière ciblée, ces traitements limitent ainsi les dommages occasionnés sur les cellules saines. La mise sur le marché en 2000 du Trastuzumab (Herceptine®) a été une révolution pour la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer du sein HER2+, d'autant plus que ce sous-type de cancer est associé à un pronostic péjoratif. La protéine HER2 est située à la surface des cellules du sein et est impliquée dans les différents processus d'oncogénèse. En bloquant le récepteur HER2, le Trastuzumab bloque la division des cellules tumorales et entraîne leur apoptose (Maximiano et al., 2016). Pour les cancers du sein métastatiques, d'autres thérapies ont été développées qui ciblent l'angiogénèse (Bevacizumab, Avastin®) ou des récepteurs protéines kinases (Lapatinib Tyberb®, Everolimus Afinitor®) (Opdam et al., 2012 ; Manso et al., 2015).

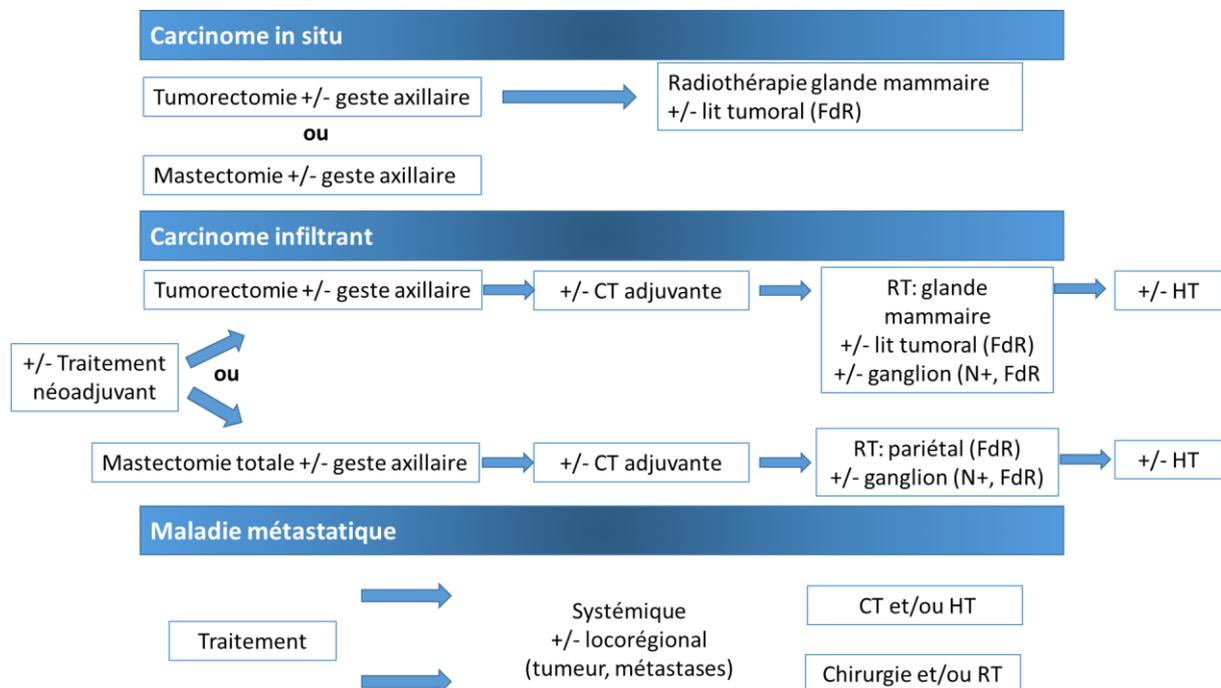


Figure 24. Prise en charge thérapeutique du carcinome *in situ*, infiltrant et du cancer métastatique. FdR : facteur de risque, RT : Radiothérapie, HT : hormonothérapie ou thérapie ciblée (HER2) (Adapté de Guide – Affection longue durée – Cancer du sein, Haute Autorité de Santé).

5. Hétérogénéité phénotypique tumeur primaire-métastases

Comme nous l'avons évoqué, la stratégie de prise en charge thérapeutique du cancer du sein métastatique dépend de plusieurs paramètres. Elle dépend essentiellement des caractéristiques histologiques de la tumeur primitive, des traitements antérieurs et de leur tolérance, du site des localisations métastatiques, du délai avant la rechute, mais aussi des facteurs prédictifs de réponse au traitement (statut ER, PR ou encore HER2) (HAS/INCA, 2010). La caractérisation moléculaire des tumeurs est apparue comme un élément primordial dans la prise en charge thérapeutique, mais il existe des discordances phénotypiques entre la tumeur primitive et les métastases, ce qui tend à reconsidérer le statut moléculaire de ces lésions secondaires, ceci dans le but de traiter efficacement les patientes. En effet, la perte d'un facteur prédictif (HER2, ER, PR) peut conduire à la prescription d'un traitement inutile et potentiellement toxique. A l'inverse, le gain d'un biomarqueur pourrait offrir des perspectives de traitement intéressantes chez des patientes n'ayant initialement pas bénéficié d'un traitement le ciblant. Comme décrit dans la partie 3, plus d'un tiers des patientes présentent des métastases (avec atteinte ganglionnaire ou métastases à distance) au moment du diagnostic. De plus, plus de 20 % des patientes initialement diagnostiquées avec un cancer du sein localisé vont rechuter avec des métastases à distance. Cette hétérogénéité soulève donc un problème majeur dans la prise en charge de ces patientes.

5.1 Généralités

Il a pendant longtemps été admis que toutes les cellules composant les tumeurs étaient équivalentes entre elles et étaient le fruit de l'évolution d'un seul clone. Mais aujourd'hui la vision d'une tumeur faite uniquement de cellules cancéreuses semblables laisse la place à celle d'une masse tumorale hétérogène, faite de plusieurs types de cellules cancéreuses. Cette hétérogénéité tumorale peut ainsi exister à différentes échelles. Elle peut concerner le cancer d'un même organe chez différentes patientes, c'est l'hétérogénéité **inter-patiente**. Par exemple, dans le cas du cancer du sein, on note une hétérogénéité histologique et moléculaire (HER2, PR, ER). L'hétérogénéité existe également entre sous-populations de

cellules cancéreuses : on parle d'**hétérogénéité intra-tumorale**. Elle décrit l'existence de populations cellulaires distinctes avec des caractéristiques phénotypiques particulières. Celle-ci a été décrite dans plusieurs cancers (poumons, sein, pancréas, ovaires, rein, cerveau) (Jamal-Hanjani et al., 2015). Elle existe également entre une tumeur primitive et une récurrence loco-régionale ou à distance, on parle d'**hétérogénéité inter-métastases**. Enfin, elle a été décrite au sein d'une métastase : les lésions secondaires peuvent acquérir des nouvelles mutations et évoluer indépendamment dans cette masse, on parle alors d'**hétérogénéité intra-métastases** (figure 25). Dans le cadre de ce travail, nous nous intéressons plus particulièrement à l'hétérogénéité entre la tumeur primaire et les métastases.

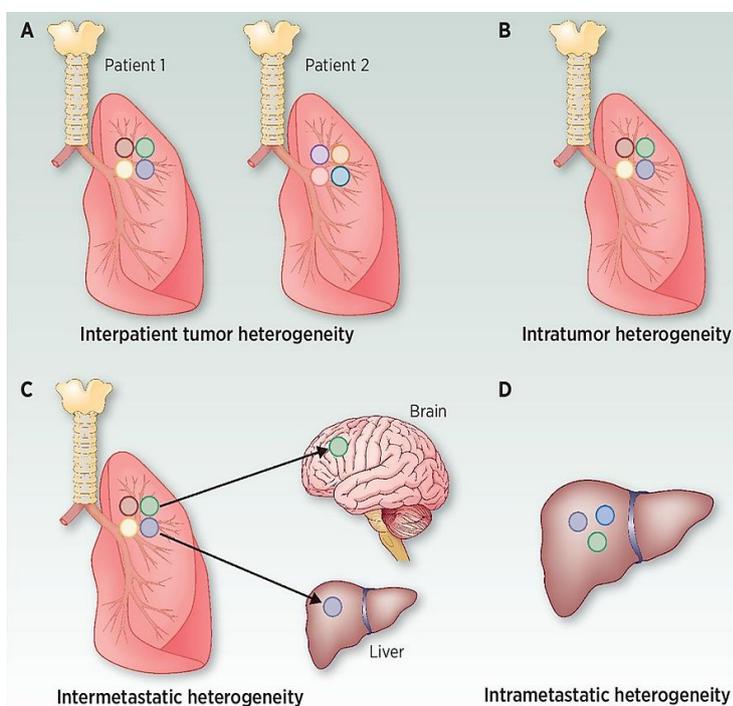


Figure 25. Différents types d'hétérogénéité. A) Hétérogénéité inter-patient ; B) Hétérogénéité intra-tumorale ; C) Hétérogénéité inter-métastatique ; D) Hétérogénéité intra-métastatique (Jamal-Hanjani et al., 2015).

5.2 Discordance entre tumeur primaire et métastases : observations

Le cancer du sein est un exemple typique d'hétérogénéité tumorale. De nombreuses publications font en effet état d'une discordance entre le phénotype de la tumeur primaire et des métastases (Rosen et al., 1977 ; Webster, Bronn, and Minton, 1978 ; Holdaway and Bowditch, 1983). Celle-ci est observée quand les caractéristiques anatomo-pathologiques, mais aussi génomiques, diffèrent entre la tumeur initiale et la récurrence à distance. Une discordance entre les statuts ER est notamment retrouvée chez 15 à 40 % des patientes (Lindström et al., 2012 ;

Foukakis et al., 2012). Pour le récepteur HER2, on la retrouve selon les auteurs chez 0 à 40 % des patientes (Guarneri et al., 2008 ; Foukakis et al., 2012). Ces chiffres diffèrent selon les études (figure 26).

En moyenne, les discordances d'expression des récepteurs à la progestérone, aux œstrogènes et de statut HER2 entre la tumeur et les métastases semblent être respectivement de 33 %, 20 % et 8 % (Roulot A et al., 2016). Il est important de souligner que cette discordance peut être bi-directionnelle. Par exemple, une tumeur primaire peut être ER+ et la lésion à distance ER- et inversement. De même, et dans le cas d'une maladie multi-métastatique, les phénotypes peuvent différer entre les différentes lésions.

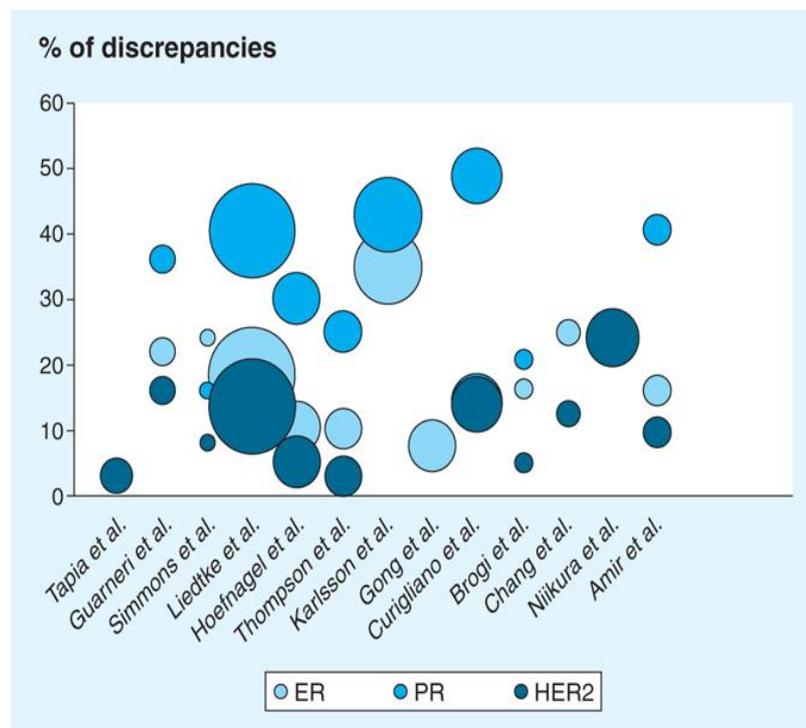


Figure 26. Hétérogénéité tumorale des cancers du sein. Pourcentage de discordance entre tumeur primaire et métastases. La taille des cercles est proportionnelle au nombre de patients de l'étude (Roulot et al., 2016).

L'hétérogénéité entre la tumeur primaire et ses métastases soulève la question de la pertinence de la prise en charge de la maladie métastatique se basant sur les marqueurs de la tumeur primitive.

5.3 Pourquoi une-t-elle discordance ?

Tous les mécanismes responsables du changement d'expression de ces récepteurs ne sont pas encore élucidés. Plusieurs faits peuvent expliquer cette discordance et incluent l'hétérogénéité intra-tumorale, des changements moléculaires au cours de l'évolution biologique de la tumeur, le micro-environnement ou encore la pression de sélection induite par les thérapies.

5.3.1 Hétérogénéité intra-tumorale : sélection clonale *vs* modèle adaptatif

Pour comprendre l'origine de ces discordances, il est nécessaire de s'intéresser au processus d'évolution tumorale. Il existe une hétérogénéité intra-tumorale marquée : toutes les cellules ne sont pas identiques et représentent une véritable mosaïque tumorale. Deux types d'explication ont été proposés afin de rendre compte de ce phénomène : l'existence de **cellules souches cancéreuses** (CSC) et l'**évolution clonale** basée sur le principe de sélection naturelle. Ces deux concepts sont à l'heure actuelle les plus évoqués pour expliquer cette hétérogénéité.

➤ Cellules souches cancéreuses (CSC)

L'existence de cellules souches cancéreuses (CSC) a été mise en évidence en 2003 à partir de métastases issues du sein (Al-Hajj et al., 2003). Selon ce concept de CSC, une seule partie des cellules tumorales est responsable de la progression tumorale. Cette population de cellules posséderait des propriétés semblables à celles de cellules souches, à savoir celles d'auto-renouvellement, de différenciation, mais aussi de quiescence (Marusyk and Polyak, 2010 ; Fulawka, Donizy, and Halon, 2014). Elles se caractérisent par leur capacité à effectuer un nombre illimité de cycles cellulaires tout en maintenant un état indifférencié. Ces cellules peuvent se diviser et donner deux CSC ou alors générer un progéniteur, cellule différenciée. De cette manière, l'auto-renouvellement de cellules souches assure la tumorigenèse alors que la différenciation serait à l'origine de l'hétérogénéité tumorale. Ainsi, les cellules souches sont au sommet de ce modèle et peuvent produire toutes les autres cellules tumorales.

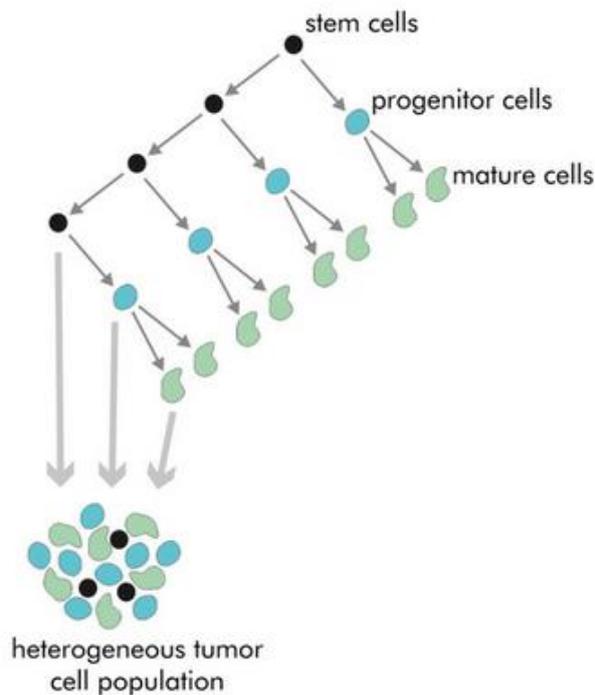


Figure 27. Modèle des CSC. Les CSC sont dotées d'une capacité à réaliser un nombre illimité de divisions. L'hétérogénéité tumorale résulte de populations aux phénotypes divers aux différents stades de maturation. (Fulawka et al., 2014).

➤ Evolution clonale

La théorie de l'évolution clonale a été proposée dès 1976 par Nowell (Nowell, 1976). Selon cette théorie, les tumeurs dérivent initialement d'une cellule unique qui devient la cible de diverses mutations. Ce phénomène conduit à la sélection de diverses sous-populations avec des phénotypes différents. La conséquence est une sélection progressive du clone le plus agressif. Selon cette théorie, la masse tumorale représente un ensemble dynamique composé de plusieurs populations de cellules tumorales transformées. Les cellules tumorales subissent des mutations *drivers*, essentielles au développement tumoral et *passengers* qui ne confèrent pas d'avantage sélectif aux cellules tumorales (Stratton, Campbell, and Futreal., 2009). Ainsi, dans ce modèle, toutes les cellules possèdent le même potentiel intrinsèque de contribution à la croissance tumorale.

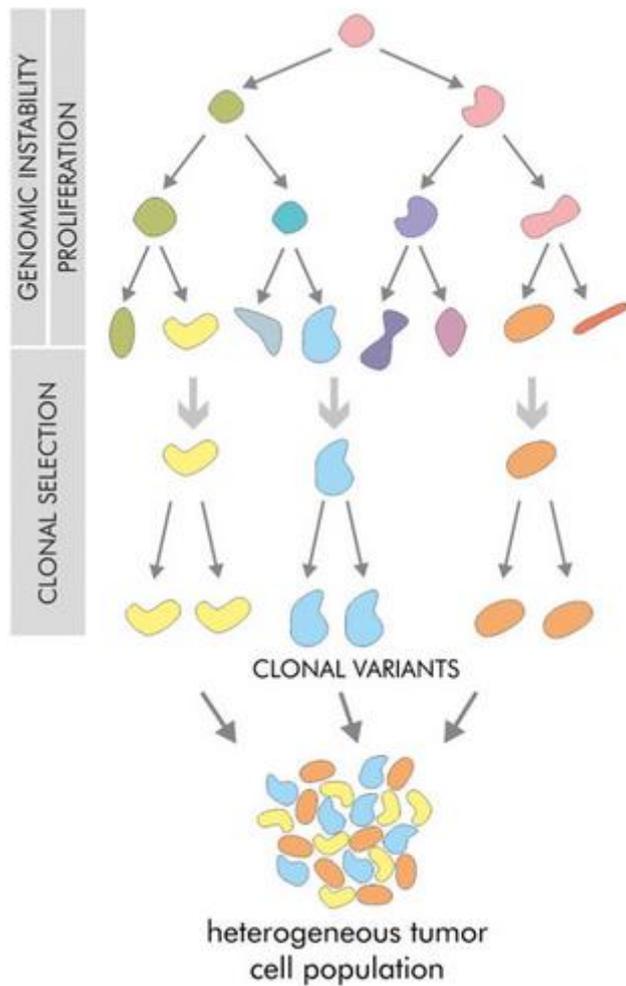


Figure 28. Evolution clonale. La tumeur évolue au travers d'accumulations d'anomalies génétiques et épigénétiques. Différents sous-clones évoluent indépendamment tout en accumulant des mutations. (Fulawka L et al., 2014).

Si ces deux théories ont pendant longtemps été considérées sans lien apparent, on admet aujourd'hui qu'elles sont complémentaires (figure 29).

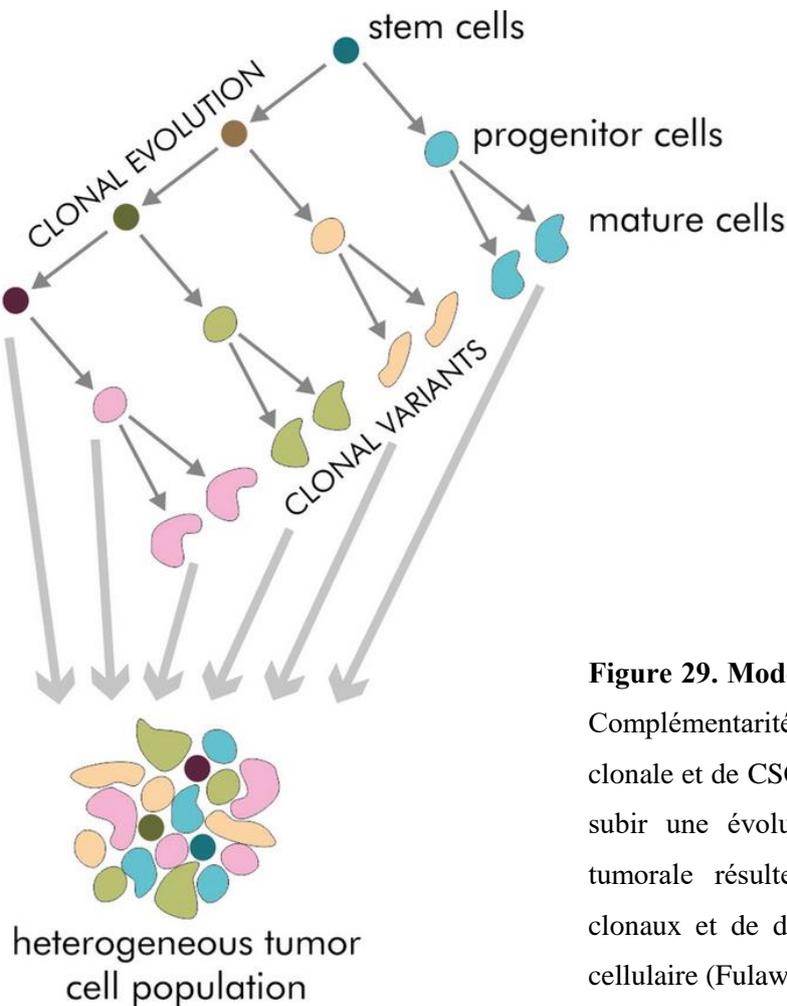


Figure 29. Modèle d'hétérogénéité tumorale. Complémentarité des modèles d'évolution clonale et de CSC. La population des CSC peut subir une évolution clonale. L'hétérogénéité tumorale résulte de l'existence de variants clonaux et de différents stades de maturation cellulaire (Fulawka et al., 2014).

5.3.2 Micro-environnement et plasticité tumorale

Comme nous l'avons vu précédemment, le micro-environnement tumoral représente une structure complexe composée de nombreux types cellulaires (cellules immunitaires, cellules endothéliales, fibroblastes...). En plus de l'hétérogénéité des cellules tumorales, il existe également une hétérogénéité du stroma tumoral (figure 30). Ce sont les différentes interactions entre les cellules tumorales et cet environnement qui contribuent à la progression tumorale (Koren and Bentires-Alj, 2015). Ces interactions ne sont pas uniformes dans la tumeur. A titre d'exemple, certaines zones dans la tumeur se trouvent à distance des vaisseaux sanguins et sont par conséquent moins oxygénées. On parle d'hypoxie intra-tumorale, responsable de modifications du métabolisme énergétique (Billaud, 2012). Cette hypoxie constitue également un facteur clé de

développement de clones tumoraux à haut potentiel métastatique (Vaupel, 2008). Par ailleurs, l'immuno-surveillance par les cellules du microenvironnement peut conduire à une sélection de sous-clones dépourvus d'antigènes ou de sous-clones avec une sensibilité vis-à-vis du système immunitaire amoindrie (Matsushita et al., 2012 ; DuPage et al., 2012).

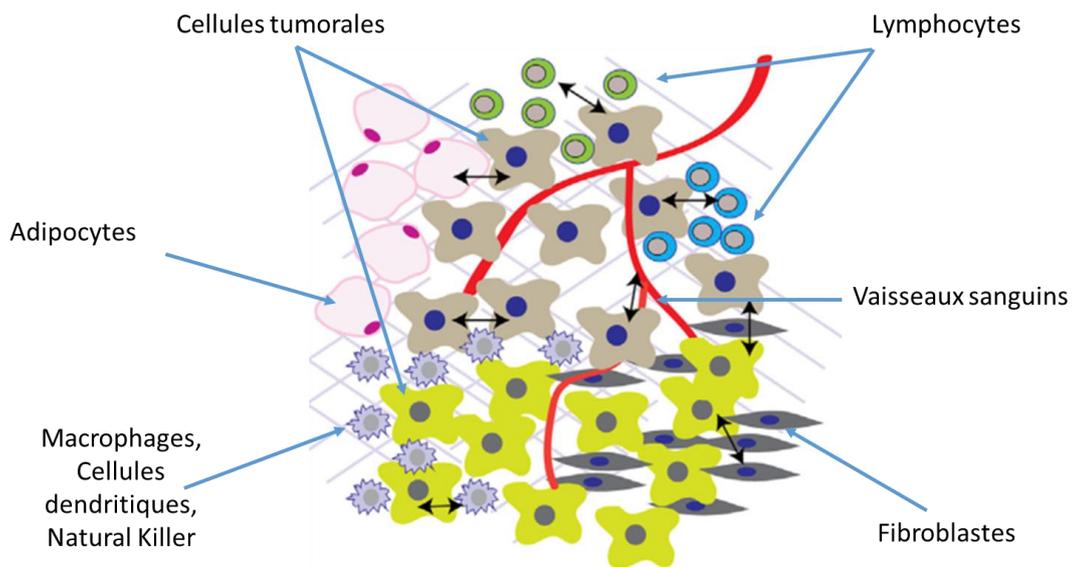


Figure 30. Micro-environnement et hétérogénéité intra-tumorale. Les différents acteurs du micro-environnement (cellules immunitaires, fibroblastes, adipocytes...) peuvent conduire à l'hétérogénéité tumorale. Adaptée de Koren et al., 2015.

5.3.3 Pression de sélection thérapeutique

La prise en charge thérapeutique des cancers, que ce soit par l'utilisation de la chimiothérapie, de la radiothérapie ou des thérapies ciblées est également à l'origine d'une hétérogénéité intra-tumorale. On peut ainsi observer, sous la pression thérapeutique, l'expansion de clones résistants pré-existants ou l'émergence de cellules devenant résistantes (figure 31) (Dagogo-Jack and Shaw, 2017). Plusieurs équipes se sont notamment intéressées à l'expression de ER chez des patientes traitées par hormonothérapie et ont observé une évolution tumorale vers des phénotypes ER⁻ (Johnston et al., 1995). Cette discordance phénotypique a également été observée après la prise en charge de patientes avec un cancer du sein invasif par chimiothérapie avec un changement dans les statuts HER2, PR et

ER observé chez 10 à 54 % des patientes (Jin et al., 2015 ; Yang et al., 2013 ; Yoshida et al., 2017).

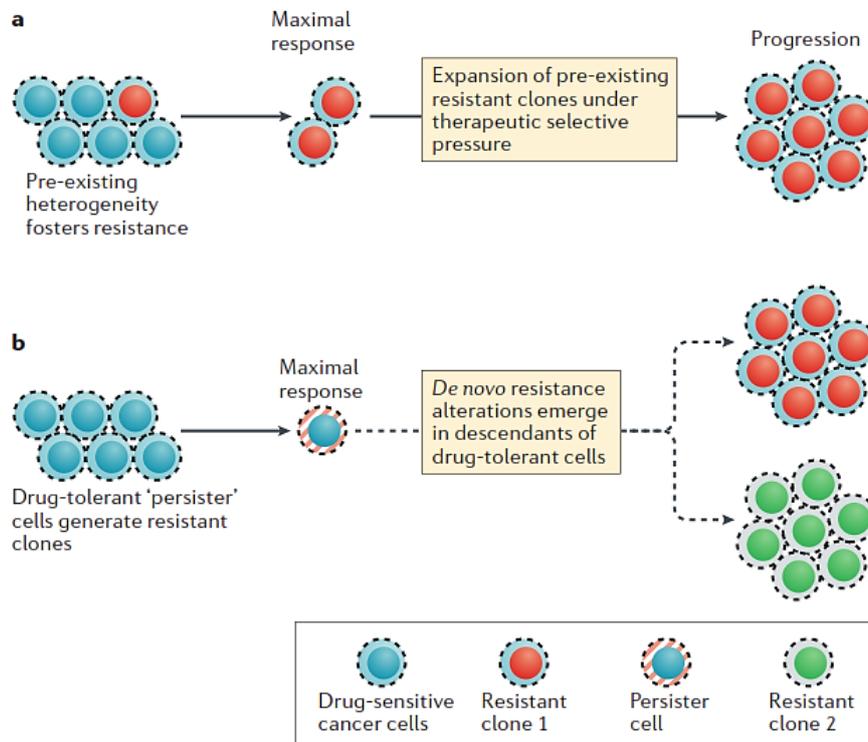


Figure 31. Thérapie et hétérogénéité tumorale. La prise en charge thérapeutique peut entraîner (a) l'expansion de clones résistants pré-existants ou (b) l'émergence de cellules résistantes (Dagogo-Jack and Shaw, 2018).

5.4 Impact de la discordance tumeur primaire-métastase sur la survie des patients et la prise en charge thérapeutique

La prise en charge thérapeutique du cancer du sein, basée sur le phénotype de la tumeur primaire pose ainsi la question de la nécessité de la réévaluation des statuts des métastases. En effet, devant cette discordance, certaines patientes reçoivent des thérapies inutiles (comme dans le cas d'une tumeur primaire HER2+ et une maladie métastatique HER2-) et d'autres peuvent ne pas bénéficier de thérapies potentiellement efficaces (tumeur primaire HER2- et une maladie métastatique HER2+). Ainsi, la survie des patientes dans ces situations est fortement impactée (figure 32) (Lindström et al., 2012).

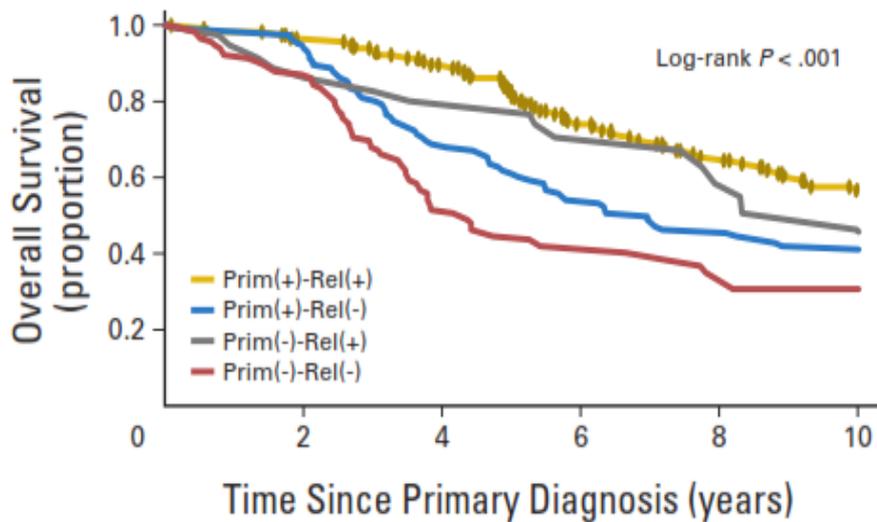


Figure 32. Survie globale des patientes depuis le diagnostic du cancer du sein en fonction du statut ER (Prim + ou -) et au niveau des métastases (Rel + ou -) (Lindström et al., 2012).

Devant ces observations, réévaluer les statuts métastatiques dans le but d'adapter le traitement est déterminant. Certaines études ont ainsi souligné cette nécessité (Botteri et al., 2012 ; Curigliano et al., 2011). Une conversion de récepteurs (HER2 et ER) a pu être mise en évidence après biopsie chez 18 des 100 patientes atteintes de cancer du sein avec métastases hépatiques. Ces patientes ont par la suite reçu un traitement en adéquation avec le statut de ces dernières : une meilleure survie a pu être associée à ce changement thérapeutique (Botteri et al., 2012). Ainsi, s'il a pendant longtemps été admis que la différence entre le profil moléculaire des métastases et de la tumeur primaire n'affectait pas la prise en charge thérapeutique de la patiente, il est primordial de réévaluer le statut des récepteurs HER2 ou hormonaux au niveau des sites de dissémination métastatique. De plus, la connaissance des mécanismes de dissémination métastatique mais aussi la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques pour la prise en charge des cancers du sein métastatiques sont cruciaux.

Face à l'hétérogénéité temporelle des cancers du sein, pouvoir évaluer le phénotype des métastases s'avère crucial pour une prise en charge adaptée des patientes. Cependant, un phénotypage par biopsie n'est pas réalisable. Dans ce cadre-là, l'imagerie nucléaire permet des investigations non invasives des phénotypes métastatiques.

6. La médecine nucléaire pour l'approche diagnostique et thérapeutique des cancers du sein métastatiques

➤ Définition

La médecine nucléaire est une discipline regroupant toutes les utilisations de radionucléides à des fins de diagnostic ou de thérapie. L'approche diagnostique repose sur l'imagerie nucléaire. C'est une technique d'imagerie fonctionnelle consistant en l'administration au patient d'une molécule spécifique d'une cible ou d'une fonction et marquée par un atome radioactif. La détection des rayonnements émis par le radioélément permet la localisation de la molécule marquée, avec une caméra TEMP (tomographie par émission monophotonique) pour les émetteurs γ , ou TEP (tomographie par émission de positons) pour les émetteurs de particules β^+ . Ces composés obéissent à la même législation que les médicaments et sont appelés médicaments radiopharmaceutiques. Les radiopharmaceutiques varient soit par la nature du vecteur (anticorps, peptides...), soit par le radioisotope utilisé pour le marquer. De par la diversité des radiotraceurs utilisables, cette modalité d'imagerie est présente dans de nombreux domaines médicaux en recherche mais également en routine clinique. L'approche thérapeutique en médecine nucléaire repose sur l'utilisation de radiopharmaceutiques couplés à des émetteurs de particules β^- ou alpha susceptibles de détruire spécifiquement les tissus cibles.

➤ Imagerie diagnostique

Différents radioisotopes sont utilisés en médecine nucléaire à visée diagnostique. Les plus couramment utilisés sont rappelés dans le tableau 4 ci-dessous. Le radiopharmaceutique le plus utilisé en cancérologie est le ^{18}F -FDG, un analogue radiomarqué du glucose dans lequel l'hydroxyle du carbone 2 de la molécule de glucose est remplacé par un atome de Fluor 18, qui se désintègre par émission β^+ . Le ^{18}F -FDG est capté par les cellules et phosphorylé en position 6 par une hexokinase, comme le glucose, mais la présence de l'atome de fluor en position 2 de la molécule de glucose bloque les étapes suivantes du métabolisme et le ^{18}F -FDG s'accumule dans les cellules sous forme de ^{18}F -FDG-6P. Le ^{18}F -FDG est capté prioritairement par les cellules très consommatrices de glucose comme le cerveau

et le foie, mais aussi par les cellules cancéreuses, qui présentent une augmentation du métabolisme glucidique. Comme nous l'avons vu, dans la prise en charge du cancer du sein, la TEP au ^{18}F -FDG s'est imposée comme un examen clé du bilan d'extension pré-thérapeutique et pour la détection précoce de la récurrence tumorale.

Isotope	Période	Emissions	Détection
^{18}F	1,83 h	β^+ (960 keV)	TEP
^{64}Cu	12,7 h	β^+ (634 keV)	TEP
^{68}Ga	1,13 h	β^+ (642 keV)	TEP
^{89}Zr	78,41 h	β^+ (897 keV)	TEP
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6,02 h	γ (141 keV)	TEMP
^{111}In	2,8 J	γ (171 et 245 keV)	TEMP
^{123}I	13,2 h	γ (159 keV)	TEMP
^{201}Tl	72,91 h	γ (167 keV)	TEMP

Tableau 4. Principaux radioisotopes utilisés en imagerie nucléaire pour le diagnostic.

➤ Test compagnon de thérapies

On appelle « test compagnon » un test diagnostique permettant de sélectionner, parmi des patients diagnostiqués pour une maladie donnée, uniquement ceux chez lesquels le traitement est susceptible d'apporter un bénéfice, et ce en fonction de leur statut pour un marqueur prédictif identifié par le test. C'est donc un test « compagnon » de l'administration du traitement (HAS, Guide méthodologique, 2014). Actuellement, la prescription de thérapies ciblées est guidée par les caractéristiques moléculaires de la tumeur de chaque patient. A titre d'exemple, l'amplification de HER2 est systématiquement recherchée chez les patientes atteintes d'un cancer du sein, pouvant bénéficier du Trastuzumab. Parallèlement à leur potentiel d'identification de patients éligibles à des thérapies ciblées, les marqueurs compagnons permettent de suivre l'efficacité de ces thérapies.

Comme nous l'avons décrit précédemment, le phénotype des métastases peut différer de celui de la tumeur primaire. Ainsi, déterminer le statut moléculaire des métastases est indispensable pour traiter efficacement les

patientes. Dans ce cadre-là, l'apport de l'imagerie nucléaire est indéniable. Elle permet de phénotyper les lésions secondaires, de manière non invasive et très sensible. Ainsi, développer des traceurs compagnons permettrait de sélectionner les patientes pouvant bénéficier des thérapies ciblant notamment HER2, ER, PR, mais aussi d'autres cibles particulièrement prometteuses en cours de développement (figure 33).

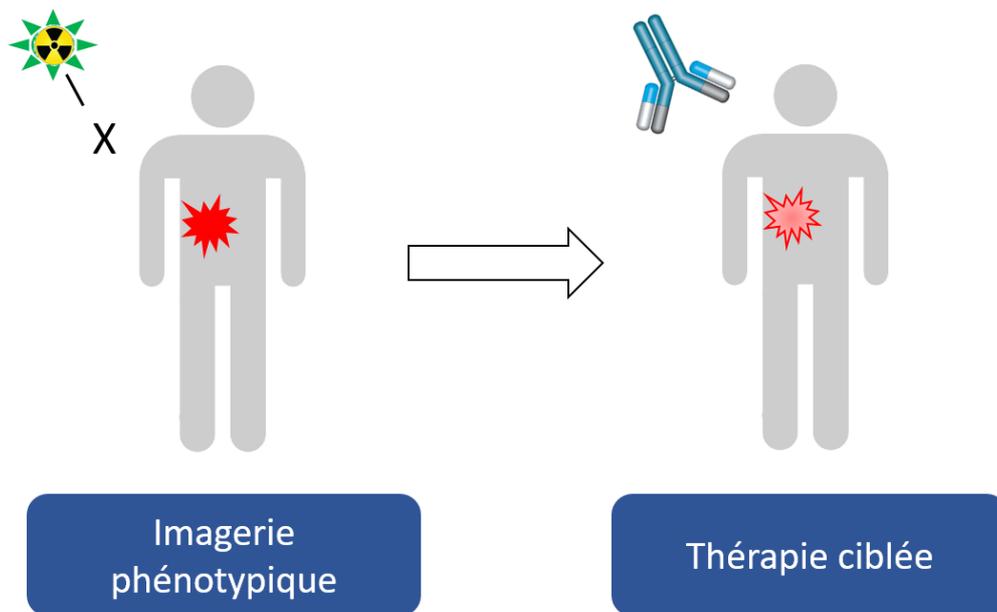


Figure 33. Test compagnon et imagerie nucléaire. Une imagerie phénotypique d'une cible tumorale particulière est réalisée à l'aide d'un agent d'imagerie (gauche) et permet de sélectionner les patients éligibles à une thérapie spécifique de cette même cible (droite).

Des investigations de l'hétérogénéité des cancers du sein métastatiques ont récemment été réalisées en imagerie nucléaire, à l'aide d'agents ciblant la protéine HER2. Il a ainsi pu être mis en évidence, de manière non invasive, une discordance entre la tumeur primaire et les métastases (Sørensen et al., 2016 ; Ulaner et al., 2016). Ulaner et al. ont ainsi réalisé des imageries à l'aide du ^{89}Zr -Trastuzumab chez des patientes avec une tumeur primaire HER2 - et ont pu mettre en évidence des lésions secondaires positives. Cette discordance a permis la mise en place du traitement anti-HER2 chez ces patients et une réponse anti-tumorale a pu être mise en évidence (figure 34).

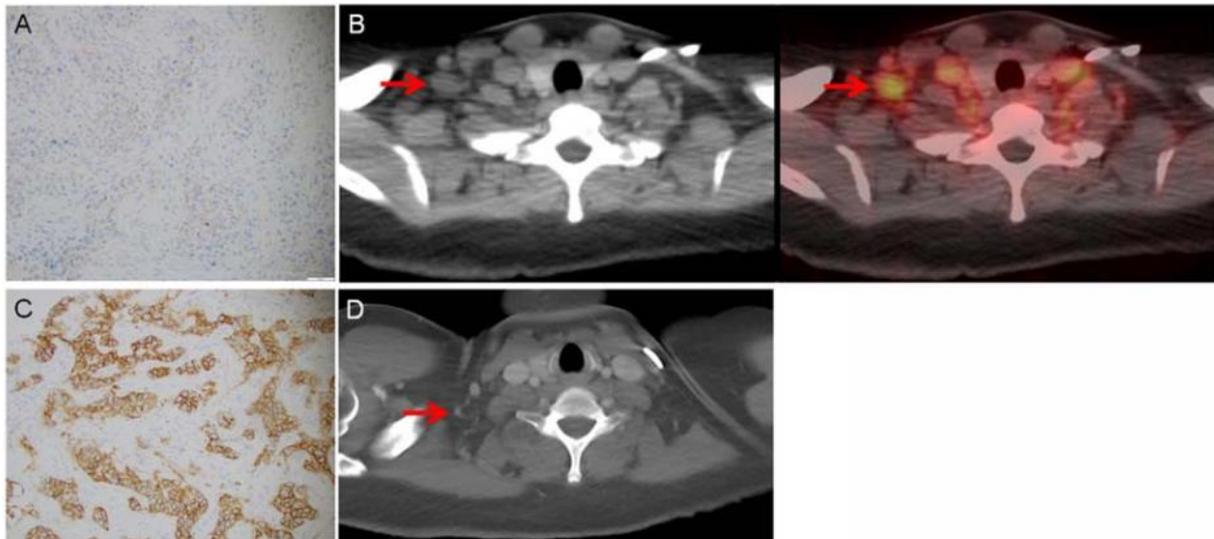


Figure 34. Mise en évidence de lésions métastatiques HER2+ chez une patiente diagnostiquée avec une tumeur primaire HER2-, en imagerie TEP à l'aide du ^{89}Zr -Trastuzumab en imagerie TEP. A) IHC d'un carcinome invasif HER2-. B) Coupe transversale d'une image TDM (gauche) et d'une image TEP-TDM fusionnée. La flèche rouge indique la présence d'une métastase au niveau du ganglion supra-claviculaire captant le traceur. C) Mise en évidence de l'expression HER2 au sein de la métastase. D) Imagerie TDM réalisée 2 mois après la thérapie ciblée dirigée contre HER2 (Trastuzumab) montrant une diminution de la taille de la lésion (Ulaner et al., 2016).

Ces résultats mettent en lumière le caractère primordial de la réévaluation du statut des patientes avec un cancer du sein métastatique. Plus de 900 000 patientes vivent avec un cancer du sein métastatique et plus de 50 000 sont diagnostiquées chaque année aux Etats-Unis (Johnson, Chien, and Bleyer, 2013). Si 80 % des tumeurs primaires sont HER2-, et qu'une discordance entre TP et métastases est retrouvée dans 10 % des cas, cela représente 72 000 patientes ne bénéficiant pas de la thérapie ciblée contre HER2. Ainsi, réaliser l'imagerie HER2 chez ces patientes leur permettrait de potentiellement bénéficier d'un traitement efficace.

➤ [Radiothérapie interne vectorisée](#)

En plus de son potentiel à réaliser l'imagerie d'une cible tumorale, la médecine nucléaire offre également des perspectives thérapeutiques intéressantes. La radiothérapie interne vectorisée (RIV) ou radiothérapie métabolique est une forme de radiothérapie interne utilisant des radiopharmaceutiques à tropisme tumoral. Elle consiste à irradier spécifiquement des cibles tumorales à l'aide de ces

molécules marquées par des radionucléides émetteurs de rayonnements β^- , α ou encore d'électrons Auger, injectées par voie intraveineuse. Différents vecteurs peuvent être utilisés : un anticorps (radioimmunothérapie) ou encore un peptide (radiopeptidothérapie). L'efficacité et la toxicité de la RIV dépendent de plusieurs paramètres et notamment de la nature du vecteur, de l'antigène, mais aussi du radioélément. Les lésions radio-induites par ces radioéléments peuvent concerner les protéines, les glucides et les lipides, mais également les acides nucléiques (ARN et ADN) (Daly, 2012 ; Baskar et al., 2014). Plusieurs types de lésions au niveau de l'ADN peuvent survenir : des cassures simples ou double-brin, liaisons ADN-ADN ou ADN-protéine (Prise et al., 2005). Les radiations peuvent aussi activer des récepteurs de mort cellulaire (Maier et al., 2016). Les émetteurs β^- sont particulièrement utilisés pour la radiothérapie ciblée. Ils permettent de déposer une énergie (0,05-2,3 MeV) sur des parcours de l'ordre du millimètre. Leur utilisation en RIV permet donc d'envisager la destruction de cellules adjacentes aux cellules ciblées. On parle de mécanisme « feu croisé » qui augmente l'efficacité du traitement. Leur efficacité est aussi le fruit de l'effet **Bystander** : il traduit le phénomène par lequel des dommages cellulaires sont transmis aux cellules voisines non irradiées.

Les cibles les plus pertinentes pour la RIV sont des masses tumorales de petite taille où l'accumulation du radiopharmaceutique est importante et homogène. La maladie métastatique est typiquement une situation pouvant mettre en jeu des petites tumeurs. Les rapports d'activité entre la tumeur et les tissus normaux doivent être également les plus élevés possibles dans le but de réduire leur irradiation au minimum.

➤ L'approche théranostique

La combinaison de l'imagerie nucléaire à visée diagnostique et de la radiothérapie constitue l'une des approches prometteuses et en plein essor pour la prise en charge des cancers en médecine nucléaire. Cette combinaison porte le nom de théranostique (Yordanova et al., 2017). L'approche théranostique consiste en l'utilisation au préalable de l'imagerie dans le but de cartographier les cellules cancéreuses pour ensuite les traiter de manière ciblée (figure 35). Un exemple

typique en théranostique est l'utilisation de traceurs marqués au gallium 68 (^{68}Ga) émetteur beta+ pour le diagnostic, suivi d'une thérapie ciblée en marquant le même composé avec des radionucléides émetteurs beta - comme le lutétium 177 (^{177}Lu) ou l'yttrium 90 (^{90}Y). Ces 3 radioéléments aux conformations chimiques proches peuvent en effet se complexer au même groupement pour le radiomarquage de la molécule d'intérêt.

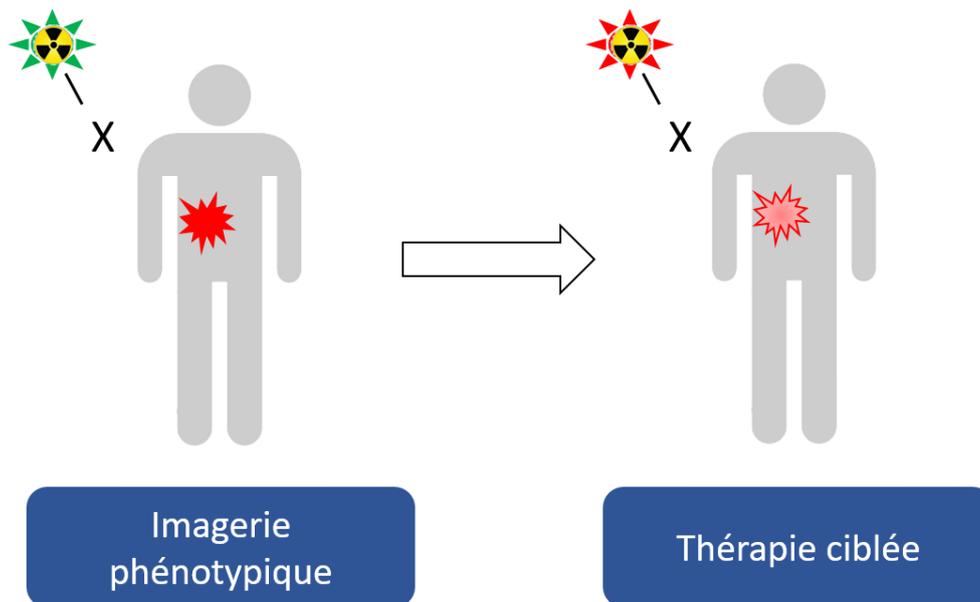


Figure 35. Utilisation d'un agent théranostique en médecine nucléaire. Combinaison d'une imagerie phénotypique initiale (à gauche) suivie d'une thérapie ciblée lorsque la tumeur exprime la cible du traceur (à droite). Une imagerie phénotypique peut ensuite être utilisée pour valider l'efficacité thérapeutique.

Les grandes avancées dans le champ des radiothérapies ciblées ont permis des progrès remarquables dans la prise en charge des patients avec un cancer de la prostate ou encore avec des tumeurs neuroendocrines tout en montrant des effets secondaires limités (Yordanova et al., 2017).

➤ Cancer de la thyroïde et traitement à l'iode 131

L'iode 131 (^{131}I), qui possède un tropisme pour la thyroïde, a été le premier radioélément utilisé en thérapie interne, dès 1946, chez des patients avec cancer de la thyroïde. Depuis, l' ^{131}I demeure l'outil thérapeutique de référence pour la prise en charge des patients atteints d'un cancer de la thyroïde différencié (Luster

et al., 2008). Ce radioélément émet des particules β^- et cette désintégration s'accompagne de rayonnements γ permettant la réalisation d'une imagerie TEMP en même temps que la radiothérapie ciblée. Le diagnostic peut également être réalisé avec de l'iode 123, un émetteur de rayonnements gamma dont l'énergie principale est mieux adaptée aux caméras TEMP, ce qui permet d'obtenir des images de meilleure qualité et d'améliorer la sensibilité du diagnostic.

➤ MIBG

Le métaiodobenzylguanidine (MIBG) est un analogue de la noradrénaline qui peut être radiomarké à l'iode 123 ou à l'iode 131. Il s'agit de ce fait d'un agent théranostique. Ces deux composés, ^{123}I -MIBG et ^{131}I -MIBG sont utilisés pour le diagnostic des tumeurs neuroendocrines comme les phéochromocytomes ou les neuroblastomes. La thérapie par ^{131}I -MIBG a montré des résultats probants dans le traitement des neuroblastomes réfractaires aux thérapies conventionnelles (Matthay et al., 2007).

➤ Ligand du PSMA

Deux ligands du PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen) ont récemment été développés pour l'imagerie TEP des tumeurs de la prostate (^{68}Ga -PSMA-617 et le ^{68}Ga -PSMA-11) (Yordanova et al., 2017). Le PSMA-617 a été sélectionné comme vecteur pour le développement d'un agent théranostique ^{68}Ga -PSMA-617/ ^{177}Lu -PSMA-617. L'innocuité du ^{177}Lu -PSMA-617 ainsi que son potentiel thérapeutique ont récemment été démontrés (figure 36) (Rahbar et al., 2016 ; Hofman MS et al., 2018). Une phase III est actuellement en cours avec cet agent, chez des patients présentant un cancer de la prostate métastatique (NCT03511664).

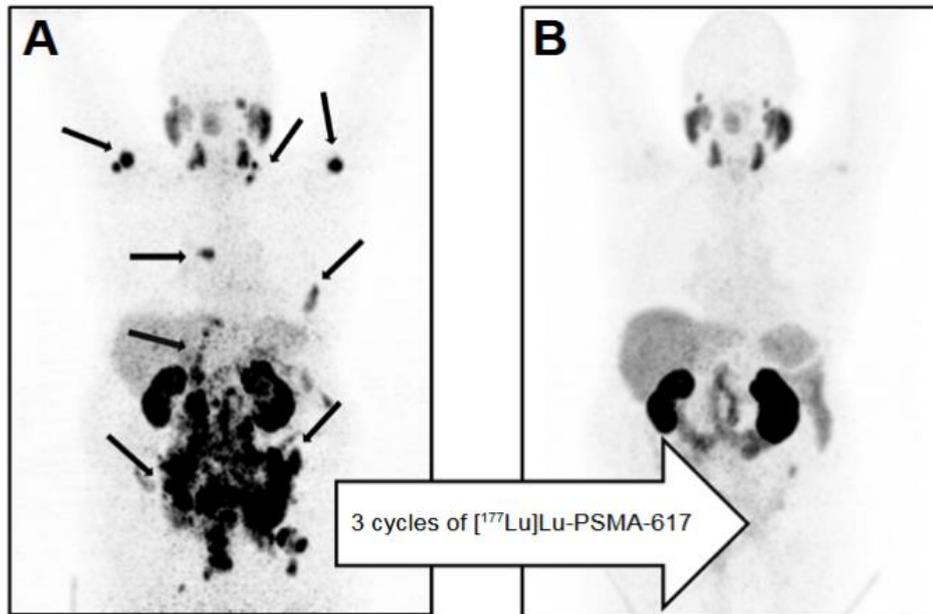


Figure 36. Exemple clinique de l'efficacité d'un agent théranostique ciblant le PSMA.

A) Imagerie phénotypique des lésions ganglionnaires, péritonéales et osseuses exprimant le PSMA avec le ^{68}Ga -PSMA-617, chez un patient avec un cancer de la prostate métastatique. B) Imagerie réalisée après 3 cycles de ^{177}Lu -PSMA-617 mettant en évidence une nette régression de la pathologie (Rahbar et al., 2016).

➤ Analogue de la somatostatine

Des agents théranostiques ciblant le récepteur à la somatostatine ont également été développés. Il existe des traceurs marqués au ^{68}Ga et au ^{177}Lu pour le diagnostic et la thérapie des tumeurs neuroendocrines exprimant ce récepteur et notamment un peptide, le DOTA-TATE (Haug et al., 2009 ; Kayani et al., 2008). Le ^{177}Lu -DOTA-TATE (Lutathera®) a montré une amélioration de la survie chez des patients avec des tumeurs neuroendocrines métastatiques de l'intestin moyen (Etude de phase III NETTER-1) (Strosberg et al., 2017). Ce traitement développé par la société Advanced Accelerator Applications AAA a récemment été approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) et l'European Medicines Agency (EMA).

Ce nouveau concept de médecine théranostique est particulièrement intéressant en cancérologie en raison de l'hétérogénéité des phénotypes métastatiques, et particulièrement dans le cancer du sein où les lésions secondaires adoptent un phénotype différent de la tumeur primaire. En adaptant la thérapie selon le phénotype de ces lésions, la médecine théranostique peut conduire à des soins plus efficaces pour les patients tout en réduisant les traitements lourds et inutiles.

6.1 Anticorps et fragments d'anticorps comme vecteur

Un traceur d'imagerie moléculaire pertinent doit réunir certains critères. Il doit présenter une haute affinité et spécificité pour une cible donnée ainsi qu'une pénétration tissulaire satisfaisante. De plus, la clairance sanguine du traceur doit être rapide dans le but de minimiser le bruit de fond. Ces critères sont principalement liés aux caractéristiques intrinsèques du vecteur. La biodistribution d'un traceur est cruciale dans l'approche thérapeutique où il est essentiel de minimiser la fixation non spécifique dans les tissus sains afin de ne pas les endommager.

➤ IgG conventionnelles et anticorps monoclonaux

Depuis les années 90, les anticorps monoclonaux (AcM) ont largement été utilisés pour le traitement des cancers, si bien qu'ils constituent aujourd'hui l'une des stratégies thérapeutiques les plus prometteuses dans les hémopathologies malignes et les cancers solides (Coulson, Levy, and Gossell-Williams, 2014). Les anticorps, ou immunoglobulines G (IgG), sont des molécules symétriques en forme de Y composées de 4 chaînes polypeptidiques identiques 2 à 2. On distingue 2 chaînes lourdes (H pour heavy) de 50 kDa chacune et 2 chaînes légères (L pour light) de 25 kDa chacune. Elles sont reliées entre elles par des ponts disulfures et forme une structure de 150 kDa (figure 37). Chaque chaîne légère est constituée d'un domaine constant (CL) et d'un domaine variable (VL), tandis que chaque chaîne lourde est composée d'un domaine variable (VH) et de 3 fragments constants (CH). C'est la combinaison des domaines variables d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère qui constitue le site de reconnaissance et de liaison à l'antigène, ou paratope. Chaque région variable (VH ou VL) contient 3 boucles

hypervariables qui déterminent la complémentarité avec l'épitope de l'antigène (CDR 1 à 3 pour Complementary Determining Regions).

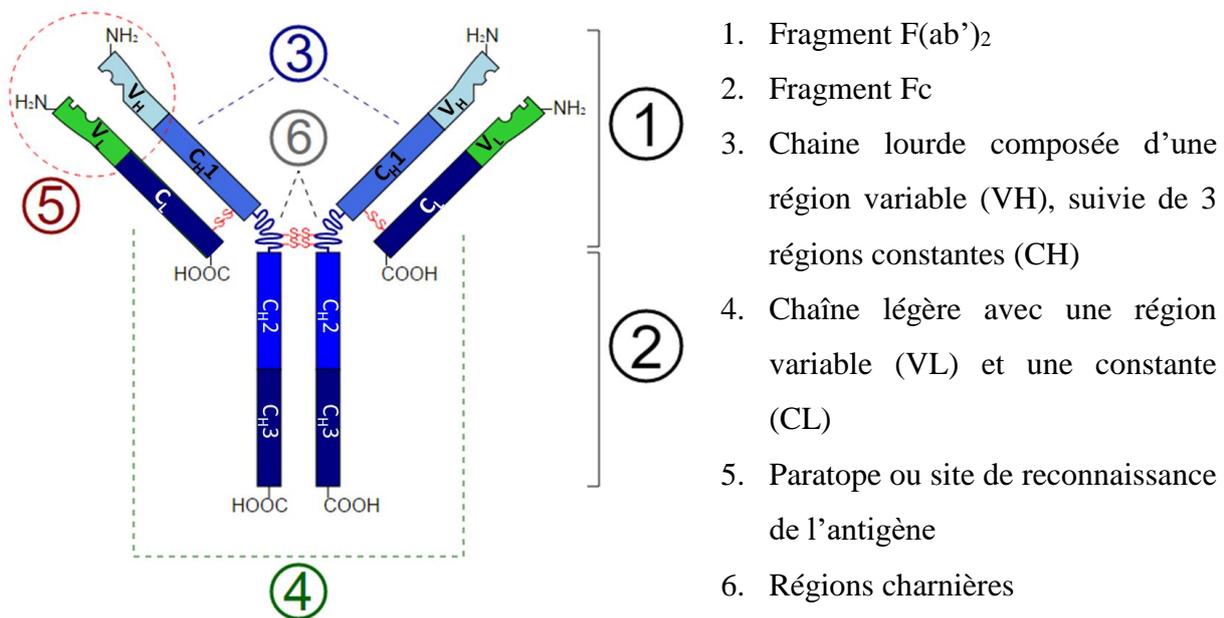


Figure 37. Structure d'un anticorps conventionnel.

Les AcM sont des IgG issus d'un seul clone de plasmocytes et reconnaissent donc le même épitope. Ils sont beaucoup utilisés dans la prise en charge des cancers, si bien que plus d'une trentaine d'AcM sont aujourd'hui sur le marché, et plus de 350 sont actuellement en développement. Cependant, malgré le principe séduisant de ces AcM, leur développement pour l'imagerie s'est heurté à plusieurs facteurs limitants. La taille élevée de ces anticorps ainsi que la vascularisation anarchique des tumeurs limitent leur capacité d'infiltration au sein de celles-ci. D'autre part, la clairance sanguine lente et les fixations non spécifiques conduisent à de faibles contrastes entre le tissu pathologique et le tissu sain. Ainsi, très peu d'anticorps entiers sont disponibles pour l'imagerie en routine clinique (Olafsen and Wu, 2010).

Le clivage des chaînes polypeptidiques par des enzymes protéolytiques a permis l'obtention de différents fragments d'anticorps plus petits que les anticorps entiers. La papaïne clive la chaîne lourde en amont de la région charnière située au niveau des ponts disulfures reliant les chaînes lourdes. Cette digestion libère 3 fragments : un Fab (Fragment Antigen Binding) qui contient la chaîne légère

complète et les domaines VH et CH1 de la chaîne lourde. Les Fab possèdent la même affinité qu'un anticorps conventionnel tout en affichant une taille 3 fois inférieure à celui-ci (55 kDa) (figure 38). Parmi les fragments d'anticorps disponibles en pratique clinique, le Fab est le plus représenté notamment pour le diagnostic des récidives de cancers colorectaux (Arcitunomab, CEA Scan®) ou celui des cancers du poumon à petites cellules (Holliger and Hudson, 2005). La pepsine clive la chaîne lourde en aval de la région charnière et libère un fragment F(ab')₂ dans lequel les deux « bras » de l'anticorps sont toujours liés par les ponts disulfures. Ce fragment possède une taille de 110 kDa.

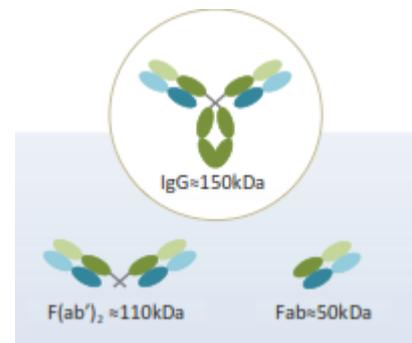


Figure 38. Structure schématique des F(ab')₂ et des Fab.

➤ Les anticorps recombinants

Aujourd'hui l'essor de l'ingénierie des anticorps et la découverte de nouveaux anticorps chez les camélidés ont donné naissance de nouveaux formats, de tailles inférieures et par conséquent plus adaptés à l'imagerie diagnostique ou à la thérapie. Dans l'optique d'obtenir des vecteurs proposant les caractéristiques idéales à une utilisation dans ce cadre, différents fragments d'anticorps conventionnels ont été générés, fruits des récents progrès dans le domaine de l'ingénierie des anticorps (Olafsen and Wu, 2010). Ainsi, des molécules contenant les domaines variables et donc la capacité de reconnaissance des anticorps sont couramment produites par génie génétique. Les scFv (single-chain variable fragment) correspondent à un assemblage des régions variables des chaînes lourdes et légères qui sont reliées entre elles par un linker. Ces scFv affichent une taille réduite, de 25 kDa, à l'origine d'une pénétration tissulaire et d'une clairance sanguine accrue. Ces scFv sont modulables et sont à l'origine de plusieurs constructions de tailles mais aussi de propriétés différentes (figure 39) (Wu and Senter, 2005).

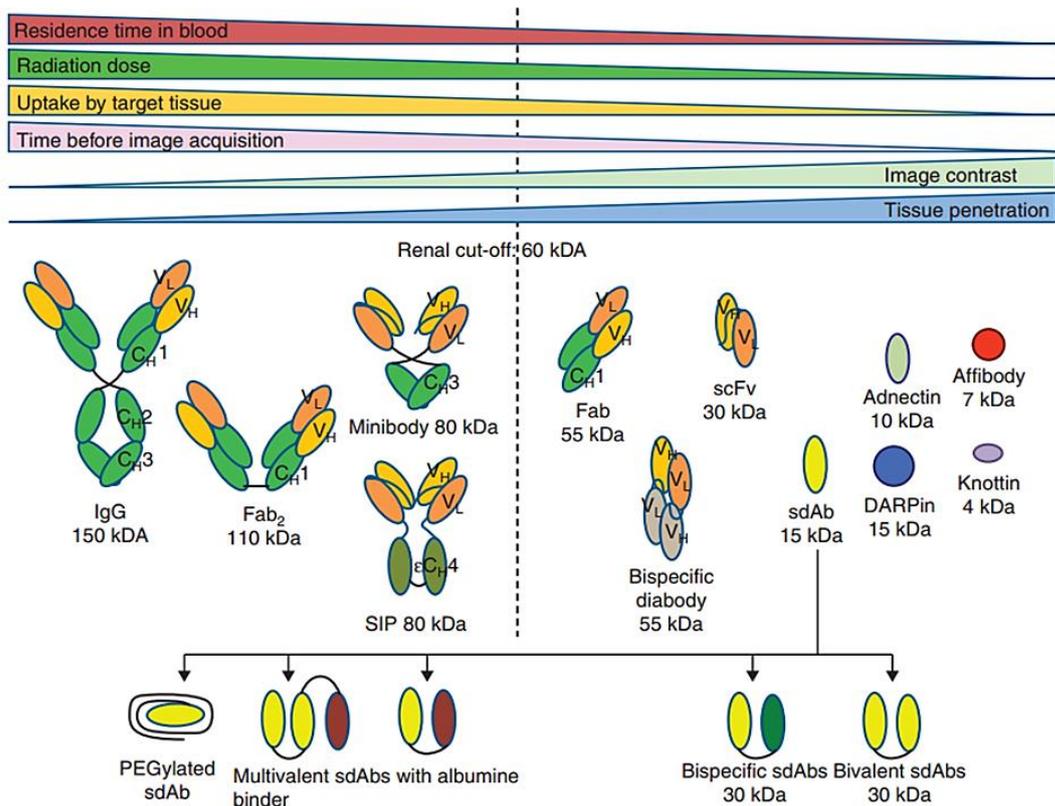


Figure 39. Les différents formats d'anticorps développés et leurs caractéristiques (De Vos et al., 2013).

Ce sont eux qui sont à l'origine d'associations de plusieurs scFv, tels que les diabodies ou les minibodies. Ces derniers ont récemment été développés dans le but d'augmenter (i) la valence de l'anticorps, c'est-à-dire le nombre d'antigènes identiques que peut fixer un anticorps, et (ii) le temps de rétention dans les tumeurs (figure 40).

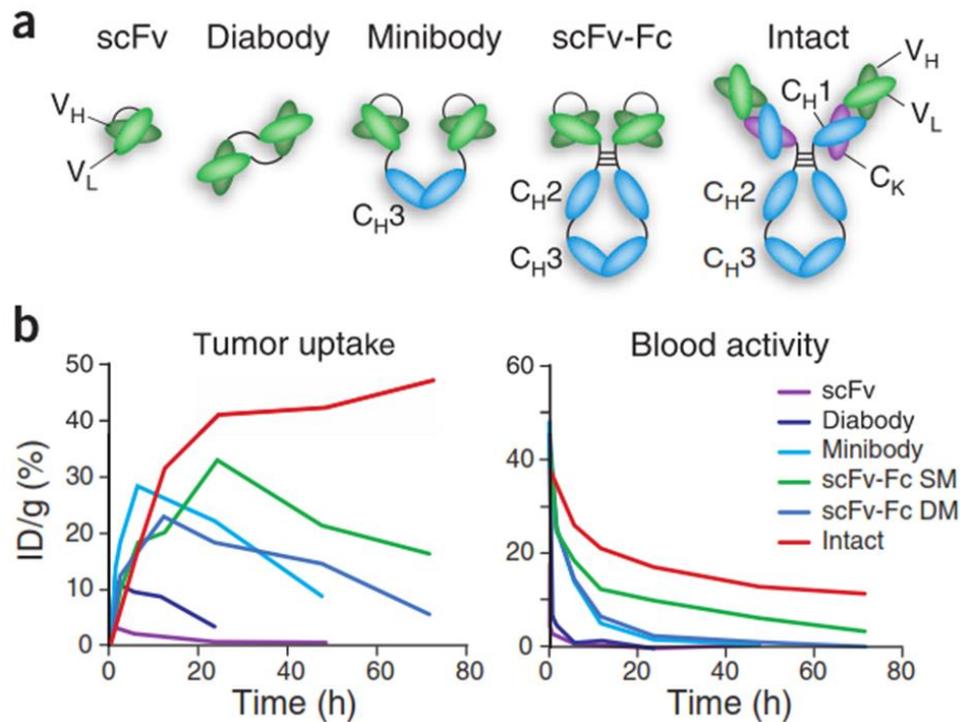


Figure 40. Les différentes constructions dérivées des scFv. a) Constructions dérivées de l'assemblage de plusieurs scFv. b) Temps de rétention tumorale et sanguine des différentes constructions (Wu and Sente., 2005).

➤ Les fragments d'anticorps de camélidés ou nanobodies

Si la structure des anticorps classiques (IgG) est relativement conservée chez les mammifères, il existe néanmoins des exceptions. Des anticorps composés uniquement de chaînes lourdes ont été découverts au début des années 90, à partir de sang de chameau (Hamers-Casterman et al., 1993). Ces anticorps particuliers sont des IgG appelées HCabs (Heavy Chain antibodies) et sont produits en plus des anticorps hétérotétramériques conventionnels chez les camélidés (chameaux, lamas, dromadaires, vigognes et alpagas). Le rôle de ces IgG à chaînes lourdes dans l'immunité des camélidés est encore loin d'être élucidé. Du fait de leur taille réduite, leur rôle dans le ciblage d'antigènes enfouis, pour augmenter le répertoire immunitaire de ces animaux a été suggéré. (Muyldermans, 2013). Trois types d'IgG différents sont produits par les camélidés. Il s'agit d'IgG conventionnels (IgG1), et des IgG2 et IgG3 (figure 41). Dans ces derniers, le domaine CH1 est absent et

l'appartenance au type IgG2 ou IgG3 est liée à la taille de la région charnière (Vincke and Muyldermans, 2012).

L'originalité de ces anticorps réside dans le fait que le paratope n'est constitué que d'un seul domaine variable appelé VHH. Il est formé d'une seule chaîne polypeptidique et possède une affinité et une spécificité similaire à celles des anticorps conventionnels. Il s'agit de l'équivalent fonctionnel du Fab des anticorps conventionnels mais avec une taille de 15 kDa seulement (De Vos et al., 2013). Le clonage des VHH, rebaptisés nanobodies du fait de leur taille de l'ordre du nanomètre, ouvre un champ d'investigations considérable en médecine nucléaire. Plusieurs nanobodies sont actuellement en cours d'évaluation pré-clinique ou en transfert clinique pour le diagnostic et la thérapie de plusieurs cancers (Chakravarty, Goel, and Cai, 2014).

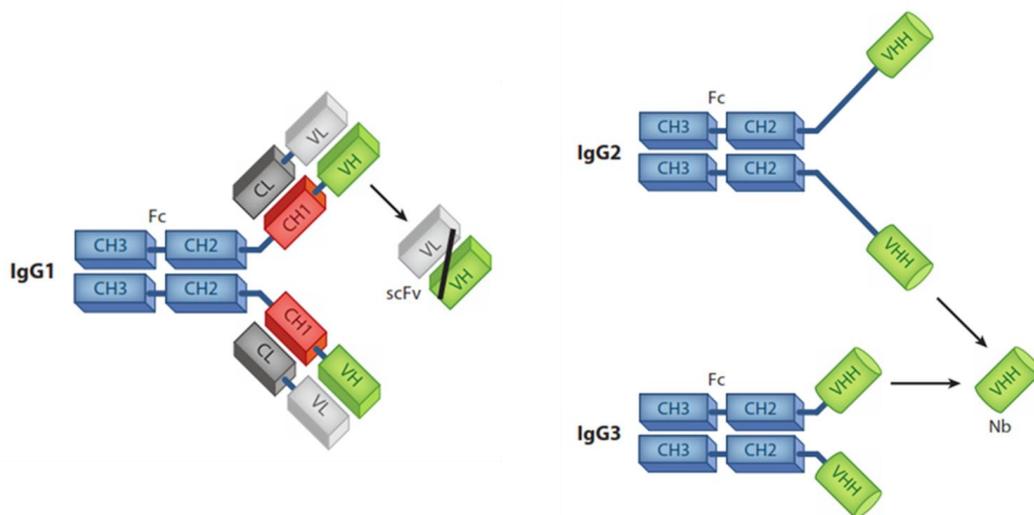


Figure 41. Représentation schématique des anticorps présents dans le sang des camélidés. IgG1 : anticorps conventionnels des mammifères ; IgG2 et IgG3 : HCabs, anticorps spécifiques des camélidés. La partie charnière des IgG2 est plus grande que celle des IgG3 (Muyldermans, 2013).

Les nanobodies présentent plusieurs avantages. Le premier réside dans leur structure monomérique qui facilite grandement leur clonage à partir des ARNm des lymphocytes B. La production de ces molécules est subdivisée en plusieurs étapes. La première étape consiste en l'immunisation d'un camélidé contre l'antigène d'intérêt. Les lymphocytes sont alors récupérés par prélèvement

sanguin. Les ARNm de ces cellules sont extraits et les séquences des VHH sont amplifiées par RT-PCR. Ce répertoire d'ARNm contient l'ARNm spécifique du VHH d'intérêt, qu'il est nécessaire d'isoler.

De nombreux systèmes de présentation sont disponibles pour la sélection *in vitro* des VHH. La technique la plus utilisée est celle du phage display qui a été décrite la première fois par Smith en 1985 (Smith, 1985). Elle consiste en la construction d'une banque de bactériophages exprimant la protéine d'intérêt, les VHH, à leur surface : la protéine d'intérêt est fusionnée à une protéine de la capsid du phage. Des bactéries *E. Coli* sont transformées avec l'ADN recombinant constitué du gène codant pour la protéine de la capsid et le gène d'intérêt, afin que le phage soit produit par la bactérie. Ces phages produits sont ensuite mis en contact avec l'antigène d'intérêt, immobilisé sur une plaque. Les phages fixés à l'antigène d'intérêt sont ceux exprimant le VHH recherché (figure 42).

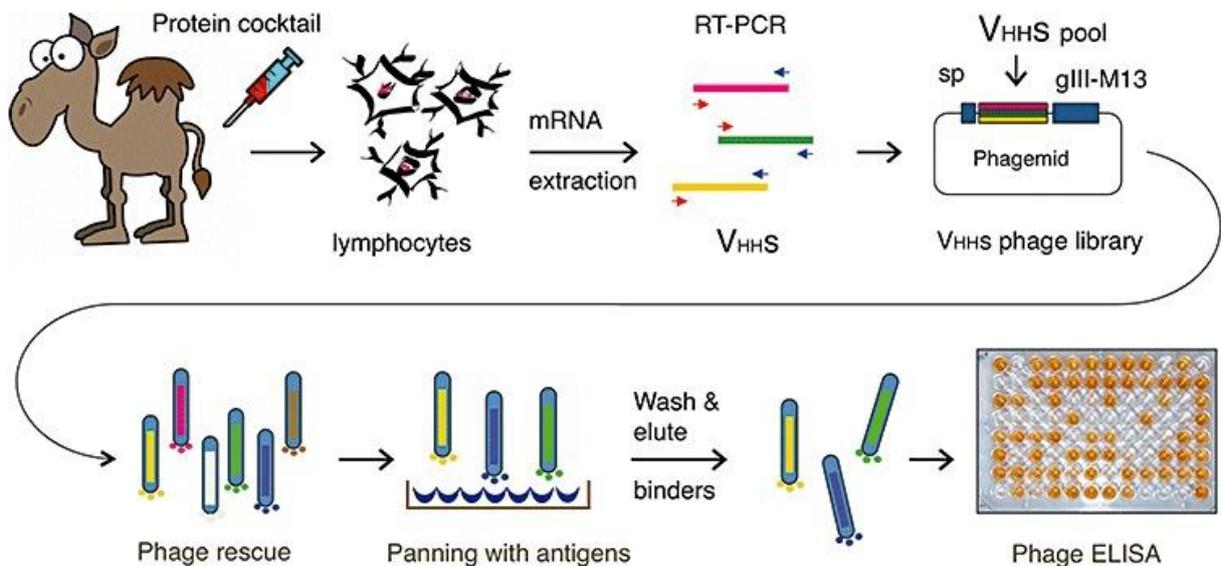


Figure 42. Processus de sélection des nanobodies (Zafra et al., 2011). Le camélidé est immunisé avec l'antigène d'intérêt. Les ARNm des lymphocytes sont isolés, rétro-transcrits et amplifiés. La sélection de la séquence est réalisée par phage display. Les clones aux meilleures affinités sont conservés pour la suite des expériences.

Une fois identifiés, les VHH sont produits par des systèmes de culture eucaryotes ou procaryotes. L'une des méthodes de production la plus fréquemment utilisée est celle utilisant *E. Coli*, qui permet une productivité importante en

conservant un coût limité (Spadiut et al., 2014). Par ailleurs, la petite taille des nanobodies leur confère une pénétration tissulaire bien meilleure que celle des anticorps conventionnels. L'accès à des épitopes enfouis est également possible (De Genst et al., 2006). Ces anticorps sont également très stables. Leurs propriétés structurales et fonctionnelles uniques confèrent à ces nanobodies un fort potentiel pour une application diagnostique et thérapeutique. Les résultats les plus prometteurs avec les nanobodies ont été obtenus en oncologie. En thérapie, les nanobodies peuvent être utilisés comme des agents neutralisants, des antagonistes de récepteurs, des véhicules de drogues cytotoxiques, mais aussi pour la radiothérapie interne vectorisée (Allegra A et al., 2018).

Pour le diagnostic, de nombreux nanobodies ont été proposés pour l'imagerie nucléaire TEP et TEMP des tumeurs, validés en pré-clinique et en cours de validation dans le cadre de phases cliniques. C'est notamment le cas des nanobodies ciblant EGFR, CEA et HER2 (Chakravarty, Goel, and Cai, 2014).

6.2 Agents disponibles pour l'imagerie phénotypique

Le cancer du sein exprimant le plus souvent des récepteurs et des antigènes bien caractérisés, il représente une indication intéressante pour l'imagerie phénotypique, d'autant que des traitements innovants ont été développés. Devant la discordance entre la tumeur primaire et la lésion métastatique, mais également entre les différentes métastases, plusieurs outils d'imagerie nucléaire permettraient de caractériser ces lésions dans le but d'adapter le traitement en fonction de l'expression de marqueurs métastatiques. Des agents ciblant le récepteur à l'œstrogène, à la progestérone mais aussi le récepteur HER2 sont des outils d'ores et déjà disponibles ou en cours de transfert clinique.

➤ HER2

Plusieurs études cliniques ont été réalisées avec le Trastuzumab, marqué au ^{64}Cu , ^{111}In ou ^{89}Zr , chez des patientes avec un cancer du sein métastatique HER2+ (Dijkers et al., 2009 ; Tamura et al., 2013). Si parmi ces différents composés, le ^{64}Cu -Trastuzumab s'affiche comme le plus à même de faire l'imagerie des lésions HER2, les fixations tumorales optimales sont obtenues 48 h après

l'imagerie. Un nanobody ciblant HER2 a récemment été produit (Vaneycken et al., 2011). Cet agent a été marqué au ^{99m}Tc et au ^{68}Ga pour l'imagerie phénotypique SPECT et TEP, et au ^{177}Lu pour la radiothérapie. Son potentiel théranostique a largement été validé en pré-clinique sur des modèles de souris porteuses de tumeurs du sein exprimant HER2 (Vaneycken et al., 2011 ; Xavier et al., 2013 ; D'Huyvetter et al., 2014).

Le transfert clinique de ce nanobody est en cours. La phase I a d'ores et déjà été réalisée chez des patientes avec un cancer du sein HER2+. Elle a permis de démontrer l'innocuité de cet agent marqué au ^{68}Ga , et sa capacité à cibler les tumeurs du sein exprimant HER2 dès 1 h après l'injection (figure 43) (Keyaerts et al., 2016). Une phase II est en cours chez des patientes avec un cancer du sein métastatique HER2+ et porte sur l'évaluation de la fixation de ce traceur au sein de métastases cérébrales (NCT03331601). Des petites molécules (affibody, ^{68}Ga -ABY-025) ont également été développées et évaluées en clinique (Sörensen et al., 2016). Des détections des lésions métastatiques HER2 ont pu être mises en évidence avec ce traceur.



Figure 43. Détection d'un cancer du sein HER2+ par un nanobody marqué au ^{68}Ga (Keyaerts et al., 2015).

➤ Récepteur à l'œstrogène (ER)

Le ^{18}F -fluorœstradiol ou FES (ESTROTEP®) est un radiopharmaceutique permettant la mesure de l'expression du récepteur à l'œstradiol développé pour l'imagerie TEP. Les performances de la TEP-FES ont été évaluées dans plusieurs études mono-centriques entre 1988 et 2011. Une fixation de la FES a pu être mise en évidence dans 53 des 57 lésions ER+ étudiées (McGuire et al., 1991). La TEP-FES est particulièrement performante pour la détection des lésions ER+ (figure 44). La sensibilité de la FES pour les lésions osseuses et pulmonaires est supérieure à 92 % (Koleva-Kolarova et al., 2015). Les performances de la TEP-FES ont également été évaluées afin de prédire la réponse au traitement hormonal dans les cancers du sein métastatiques. Chez 40 patientes, il a pu être montré une

valeur prédictive positive (VPP) de 79 % (réponse au traitement Tamoxifène® chez 19 des 24 patientes ayant une TEP-FES positive) et une valeur prédictive négative (VPN) de 88 % (absence de réponse au traitement chez 14 des 16 patientes ayant une TEP-FES négative) (Mortimer et al., 2001). Plus récemment, l'utilité de la TEP-FES dans la prédiction de la réponse au traitement hormonal a été évaluée chez des patientes avec un cancer du sein métastatique ER+. Cinq des 7 patientes avec une TEP-FES négative n'ont pas répondu au traitement hormonal (Peterson et al., 2008). Dans le cadre de l'AMM, l'impact de la TEP-FES sur la prise en charge des patients doit encore être évalué.

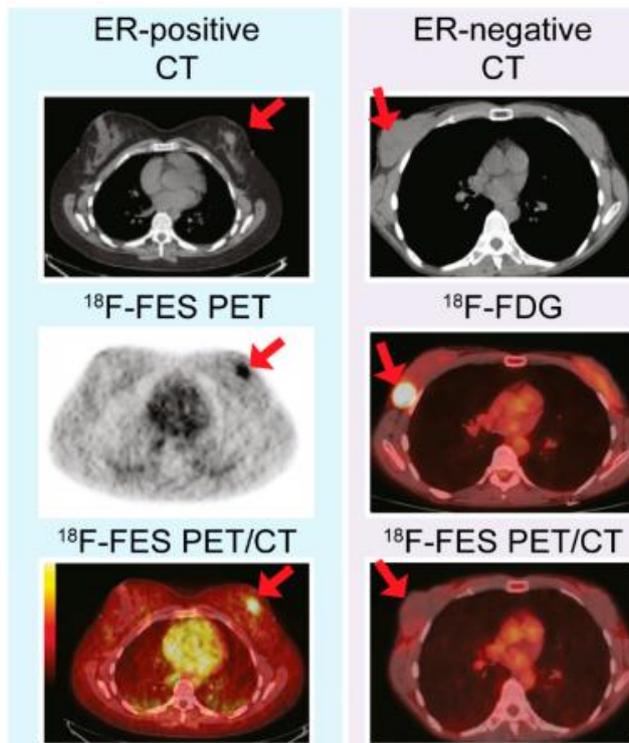


Figure 44. Exemples d'images obtenues après injection de ^{18}F -FES. Images TEP réalisées après l'injection de ^{18}F -FES chez des patientes avec un cancer du sein ER+ (gauche) ou ER- (droite). La lésion ER- est visualisée avec l'imagerie ^{18}F -FDG mais pas avec l'imagerie ^{18}F -FES (Dalm SU et al., 2017).

➤ Récepteur à la progestérone (PR)

Il a récemment été développé un traceur hautement spécifique et affin du récepteur à la progestérone, il s'agit d'un composé chimique marqué au ^{18}F pour l'imagerie TEP : le ^{18}F -FFNP. L'innocuité ainsi que le potentiel de cet agent pour l'imagerie des tumeurs exprimant PR a pu être démontré lors d'une étude de phase I réalisée chez 22 patientes avec une tumeur du sein (n=16 [PR+] et n=6 [PR-]) (Dehdashti et al., 2012) (figure 45).

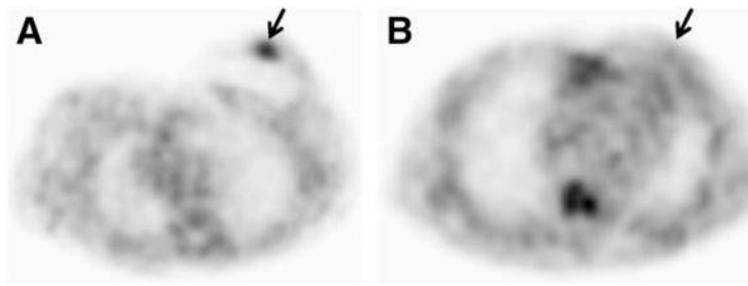


Figure 45. Imagerie du récepteur à la progestérone réalisée avec le ^{18}F -FFNP chez une patiente avec un cancer du sein PR+ (A) ou PR- (B) (Dehdashti et al., 2012).

6.3 Autres agents en cours de développement

Comme nous l'avons vu, la progression tumorale et la dissémination métastatique nécessitent de nombreux acteurs. La découverte des mécanismes impliqués dans ce processus a suscité un espoir dans la prise en charge de plusieurs cancers agressifs et notamment le cancer du sein métastatique. De nombreuses cibles ont émergées et des agents d'imagerie les ciblant sont en développement. A titre d'exemple, le RAFT-RDG et la NeoBOMB1 sont en cours d'évaluations précliniques et/ou clinique au sein du Laboratoire des Radiopharmaceutiques Biocliniques (UMR_S1039).

➤ [RAFT-RGD, ligand de l'intégrine \$\alpha\beta_3\$](#)

Le laboratoire a récemment évalué le RAFT-RGD, un marqueur de l'intégrine $\alpha\beta_3$, acteur clé de l'angiogenèse. Les intégrines, et notamment l'intégrine $\alpha\beta_3$, jouent un rôle majeur dans la migration cellulaire, l'invasion et la dissémination métastatique (Desgrosellier and Cheresh, 2010). L'intégrine $\alpha\beta_3$ est par ailleurs surexprimée par les cancers les plus agressifs et son expression est un facteur de mauvais pronostic dans le cancer du sein (Gaspirini G et al., 1998). Le RAFT-RGD a été marqué avec succès au laboratoire à l'aide de plusieurs radioisotopes pour le diagnostic, et pour la radiothérapie interne vectorisée (Sancey et al., 2007 ; Briat et al., 2012 ; Bozon-Petitprin et al., 2015 ;). Cette molécule, marquée au Gallium 68, est actuellement en cours de transfert clinique au CHU de Grenoble Alpes (CHUGA) pour l'imagerie des cancers du sein

métastatiques et des glioblastomes. La première injection à l'homme est prévue pour le premier semestre 2019.

➤ [NeoBOMB1](#)

L'expression du récepteur du peptide de libération de la gastrine (GRPR) a été rapportée dans plusieurs cancers, et il est exprimé dans 72 à 96 % des cancers du sein (Morgat et al., 2017 ; Reubi et al., 2002). De nombreux agents d'imagerie ciblant cette protéine ont récemment été évalués. L'un d'eux, NeoBOMB1, a été marqué au ^{68}Ga et au ^{177}Lu , et évalué avec succès dans des modèles murins de tumeurs de la prostate (Dalm et al., 2017). Une étude de phase I multicentrique pilotée par notre unité est en cours avec le ^{68}Ga -NeoBOMB1 chez des patients porteurs de tumeurs stromales gastro-intestinales résistantes aux thérapies conventionnelles (2016-00053-38).

Dans le cadre de cette thèse, nous avons réalisé l'évaluation pré-clinique de nouveaux agents d'imagerie ciblant deux protéines membranaires surexprimées dans les cancers du sein : la mésothéline et VCAM-1.

Ce travail comprend deux parties, l'une consacrée aux marqueurs de la mésothéline et la seconde consacrée à un marqueur de VCAM-1.

Partie I : Développement d'un traceur compagnon pour la thérapie des tumeurs exprimant la mésothéline

Partie I : Développement d'un traceur compagnon pour la thérapie des tumeurs exprimant la mésothéline

Dans cette première partie, nous nous sommes intéressés à **la mésothéline** comme cible potentielle de l'imagerie phénotypique. Il s'agit d'une glycoprotéine membranaire de 40 kDa qui possède toutes les caractéristiques d'une cible thérapeutique idéale. Elle est en effet **très faiblement exprimée par les tissus sains** et ne semble pas jouer de rôle majeur en physiologie. Elle est, en revanche, **surexprimée par près de 40 % des tumeurs solides** et notamment dans les cancers agressifs. Un tiers des cancers du sein surexprime la mésothéline. Elle joue un rôle majeur au cours de la progression tumorale : elle est notamment impliquée dans la transition épithélio-mésenchymateuse, la résistance à l'apoptose et l'invasion tumorale. Du fait de son expression restreinte en condition physiologique et de sa surexpression dans les cancers les plus agressifs, **de nombreuses thérapies ont été développées contre cette cible**. Plusieurs molécules sont actuellement en phases cliniques pour la mesure de leurs performances thérapeutiques pour les tumeurs exprimant la mésothéline. Parallèlement, **il est nécessaire de développer des marqueurs compagnons pour ces thérapies, qui permettront (1) de sélectionner les patients susceptibles d'en bénéficier (2) de suivre leur efficacité**

1. La mésothéline

1.1 Identification et découverte de la MSLN

La mésothéline ou MSLN, a été initialement identifiée par Ira Pastan et Mark Willingham (NIH) en 1992 (Chang, Pastan and Willingham, 1992). A la recherche de nouveaux antigènes tumoraux pouvant être des cibles pour l'immunothérapie des cancers, ces chercheurs ont généré et isolé un anticorps monoclonal particulier appelé K1, après immunisation de souris avec la lignée humaine de cancer ovarien OVCAR-3. Cet anticorps cible un épitope d'une protéine située à la surface des cellules tumorales ovariennes. Ils ont nommé cet antigène CAK1 (K1-reactive Antigen) (figure 46). Via l'utilisation de l'anticorps K1, ils ont démontré que l'expression physiologique de CAK1 était restreinte aux cellules mésothéliales de la plèvre, du péricarde et du péritoine. Du fait de son expression par ces cellules, CAK1 a ensuite pris le nom de mésothéline (MSLN) (Chang and Pastan, 1996). Outre sa capacité à cibler des tumeurs ovariennes, cet anticorps a également montré une réactivité importante vis-à-vis des mésothéliomes malins. L'expression de la MSLN a par la suite été confirmée dans différents cancers : pancréas, poumons, estomac, et cancer du sein triple négatif.

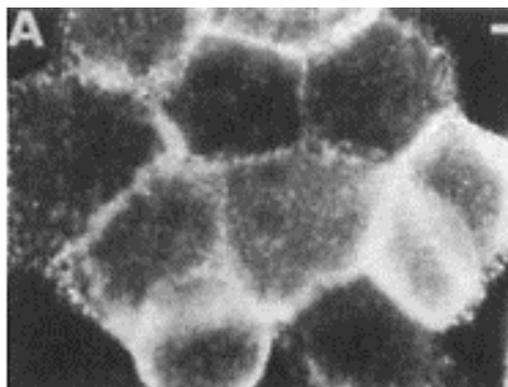


Figure 46. Immunofluorescence de CAK1 sur des cellules OVCAR-3 à l'aide de l'anticorps K1 (Chang et al., 1992).

1.2 Structure de la MSLN

La MSLN est une protéine membranaire de 40 kDa à ancre GPI (glycosyl-phosphatidylinositol). L'ancre GPI est un glycolipide permettant l'ancrage de la protéine à la membrane plasmique. La MSLN est produite sous la forme d'un précurseur de 71 kDa (628 acides aminés) codé par un ADNc de 2138 paires de bases, qui est adressé à la membrane où il va être clivé au niveau d'un site protéolytique au niveau de l'arginine 295 par une protéase endogène de type furine pour générer 2 protéines (figure 47) :

- **MPF** (Megakaryocyte Potentiating Factor - 31 kDa), est une protéine soluble, située en N-term (Ser34-Arg 286).
- **MSLN** (40 kDa) est une protéine membranaire située en C-term (à partir de Glu296).

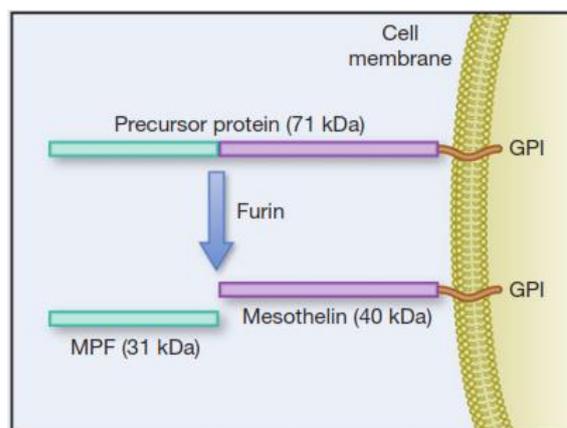


Figure 47. Structure et clivage du précurseur de la MSLN (Pastan and Hassan, 2014).

La MSLN sous sa forme membranaire de 40 kDa, peut également être clivée au niveau de l'ancre GPI pour donner naissance à une forme tronquée, soluble, que l'on nomme SMRP, pour Serum Mesothelin Relative Peptide. Ainsi, la MSLN peut exister sous 2 formes membranaires : Full-ERC/mésothéline de 71 kDa et la forme C-ERC/mésothéline de 40 kDa et 2 formes solubles : N-ERC/mésothéline ou MPF de 31 kDa et SMRP de 40 kDa (figure 48) (Einama et al., 2016). A l'heure actuelle, bien qu'il existe des logiciels de prédiction de la structure de la MSLN, qui possède notamment des motifs de répétition en tandem de type Hélice double hélice, sa structure tridimensionnelle n'est pas connue (Sathyanarayana et al., 2009). Trois variants issus d'épissage alternatif de la MSLN ont été identifiés (variant 1, 2 et 3), le variant 1 est la forme prédominante exprimée par les cellules mésothéliales ou cancéreuses (Muminova, Strong and Shaw, 2004). Le variant 1 est également celui majoritairement relargué par certaines cellules tumorales (SMRP) (Hellstrom, 2006).

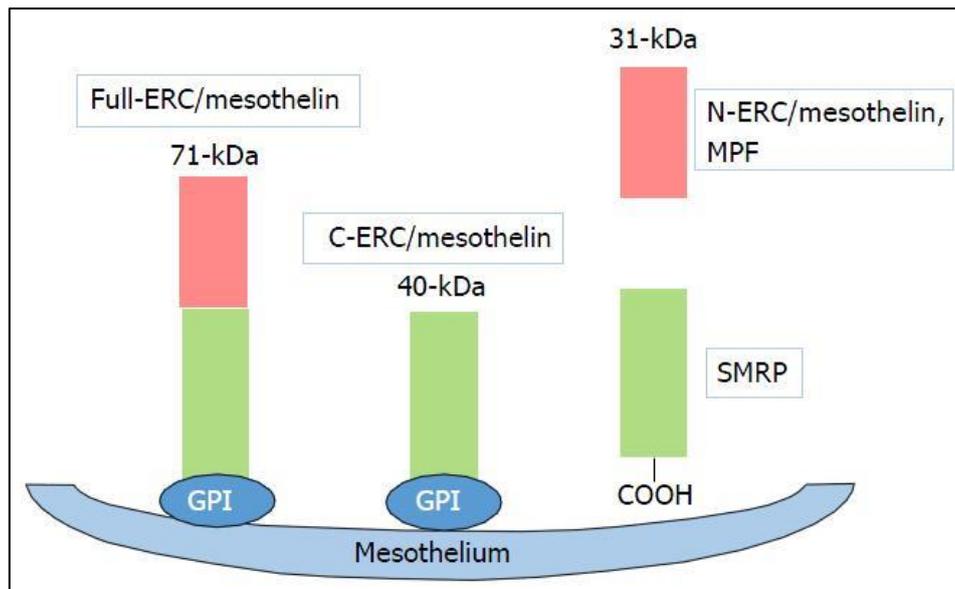


Figure 48. Schéma représentatif des différentes formes de MSLN présentes chez l'homme (Einama et al., 2016).

1.3 Fonction physiologique de la MSLN

La fonction physiologique de la MSLN reste à ce jour encore largement mal connue. Bien que les protéines à ancre GPI soient généralement impliquées dans l'adhésion cellulaire ou la signalisation cellulaire, aucune fonction biologique ne semble être associée à la MSLN. En effet, les délétions du gène codant pour la MSLN générées chez la souris par l'équipe de I. Pastan n'ont pas permis de mettre en évidence d'anomalies phénotypiques, que ce soit au niveau anatomique chez la souris ou histologique sur des coupes de tissus (cellules mésothéliales de la plèvre, du péricarde et du péritoine) exprimant la MSLN (Bera and Pastan, 2000).

Si aucune fonction biologique n'a encore été attribuée à la MSLN, l'expression du facteur MPF semble jouer un rôle physiologique. Ce facteur MPF a initialement été isolé à partir du milieu de culture de cellules tumorales pancréatiques et semble jouer un rôle de cytokine potentialisant *in vitro* l'activité de cellules de la moelle osseuse particulières, les mégakaryocytes, responsables de la production des plaquettes (Yamaguchi et al., 1994). Néanmoins, la délétion du gène codant pour la MSLN, et par conséquent du facteur MPF, sur des modèles murins, n'a pas montré d'effet sur la numération plaquettaire suggérant que le facteur MPF n'est pas essentiel à la production de plaquettes *in vivo*.

1.4 Interaction de la MSLN avec CA125

Une protéine a été identifiée comme étant l'unique ligand de la MSLN (Gubbels et al., 2006). Il s'agit de MUC16, une protéine transmembranaire, qui porte un déterminant antigénique particulier appelé CA125 (figure 49). L'antigène carbohydrate CA125 est un marqueur tumoral dosé pour le suivi de traitement des cancers épithéliaux de l'ovaire. Cette protéine peut exister soit sous une forme soluble, soit sous une forme membranaire. Bien que relativement peu spécifique, le dosage sanguin de CA125 est très utilisé dans la surveillance de ces tumeurs. L'interaction entre la MSLN et CA125 pourrait jouer un rôle clé dans la croissance et la dissémination des cellules tumorales ovariennes, pancréatiques, mais également de mésothéliomes (Muniyan et al., 2016 ; Chen et al., 2013). Il a par ailleurs été suggéré que l'expression de la MSLN sur les cellules mésothéliales du péritoine faciliterait l'implantation des cellules tumorales exprimant CA125 (Rump et al., 2004 ; Gubbels et al., 2006). De même, il semblerait qu'une interaction entre CA125 exprimée à la surface des cellules mésothéliales et la MSLN présente à la surface des cellules tumorales soit également impliqué dans l'implantation des cellules tumorales. (Hassan et al., 2010).

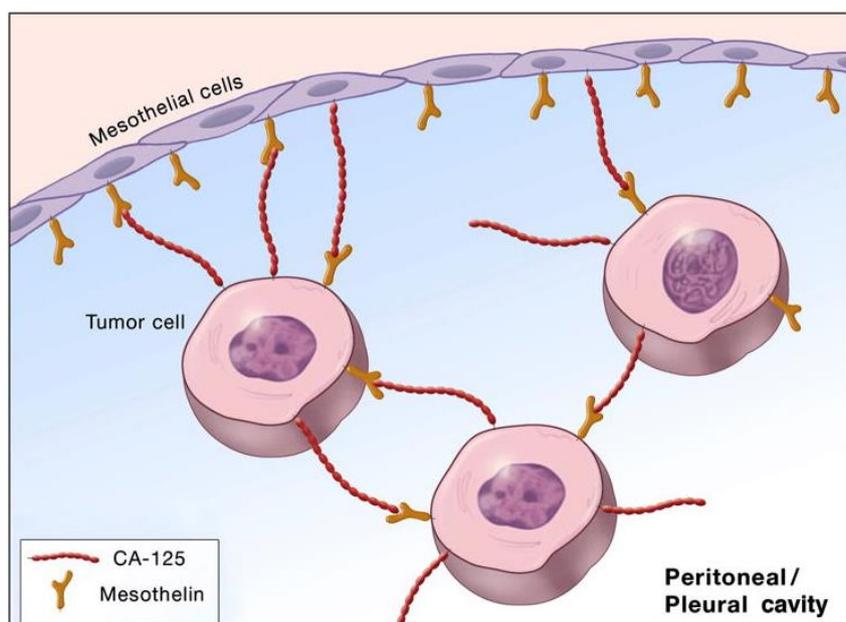


Figure 49. Modèle proposé de l'interaction MSLN-CA125 et rôle dans la dissémination métastatique (Hassan et al., 2010).

Par des méthodes de mutagenèse dirigée Kaneko et al. ont identifié un site de liaison de la MSLN à CA125. Il s'agit d'une région de 64 acides aminés, appelée IAB, située sur la partie N-terminale de la MSLN qui est la région nécessaire et

suffisante pour permettre cette interaction (Kaneko et al., 2009). Si l'interaction CA125-MSLN est impliquée dans la dissémination métastatique, cibler et inhiber celle-ci pourrait s'avérer être une stratégie pertinente pour la prise en charge des tumeurs ovariennes et des mésothéliomes. Une immunoadhésine, une protéine chimérique qui combine une séquence d'intérêt et la région Fc d'une immunoglobuline, a récemment été développée dans cette optique. Il s'agit de HN125 qui est formée de la séquence IAB, le domaine d'interaction MUC16-MSLN, fusionnée à la partie N-terminale d'une IgG1 humaine (Xiang et al., 2011). Il a pu être montré *in vitro* que HN125 abolit l'interaction MSLN-MUC16, suggérant que son inhibition pourrait être une nouvelle stratégie thérapeutique pour le cancer ovarien.

Chen et al. ont montré que l'expression de CA125 était corrélée à celle de la MSLN dans les tumeurs pancréatiques. Cette co-expression est notamment impliquée dans la motilité cellulaire et l'invasion tumorale (figure 50) (Chen et al., 2013 ; Shimizu et al., 2012). Elle est de plus associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints d'adénocarcinomes pancréatiques (Einama et al., 2011).

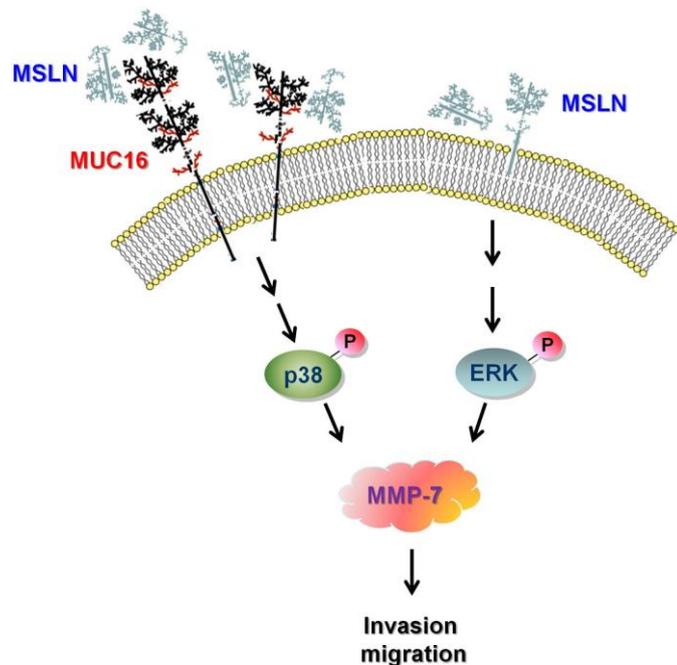


Figure 50. Voie de signalisation induite par la signalisation MSLN-MUC16 dans les cellules tumorales pancréatiques (Chen et al., 2013).

2. Mésothéline et cancer

2.1 Expression de la mésothéline dans les cancers

Initialement découverte par l'équipe de Pastan en 1992, cette nouvelle cible exprimée par les cancers de l'ovaire et les mésothéliomes a été abandonnée pendant près d'une décennie faute d'anticorps commerciaux disponibles, rendant toutes investigations de l'expression de la mésothéline à grande échelle impossibles. C'est depuis les années 2000 et l'émergence des nouveaux anticorps spécifiques de la MSLN que de nombreuses études pré-cliniques, mais également cliniques, ont été menées. Elles ont permis la mesure de l'expression de la mésothéline dans les tumeurs solides.

➤ Mésothéliomes

La MSLN est exprimée à très haut niveau dans les mésothéliomes, forme rare de cancer des surfaces mésothéliales (plèvre, péritoine). Chang et al. ont été les premiers à montrer une expression de la MSLN dans 100 % des échantillons testés (Chang, Pastan, and Willingham, 1992). Ces résultats ont été confirmés par les études immunohistochimiques menées par Ordonez N. (Ordóñez, 2003). Cette surexpression dans la quasi-totalité des mésothéliomes épithéliaux fait de la MSLN un marqueur potentiel des mésothéliomes ainsi qu'une cible thérapeutique privilégiée.

➤ Cancer du pancréas

L'analyse en série de gènes surexprimés dans le cancer du pancréas a conduit à l'identification de la MSLN comme marqueur exprimé dans la majorité des adénocarcinomes pancréatiques (PDAC) (Argani et al., 2001). Argani et al. ont confirmé une expression de la mésothéline par 90 % des lignées cellulaires issues de cancers du pancréas et une absence d'expression dans les pathologies inflammatoires de cet organe (figure 51). De même, une expression dans près de 100 % des biopsies de tumeurs pancréatiques a été rapportée (Frierson et al., 2003 ; Hassan et al., 2005).

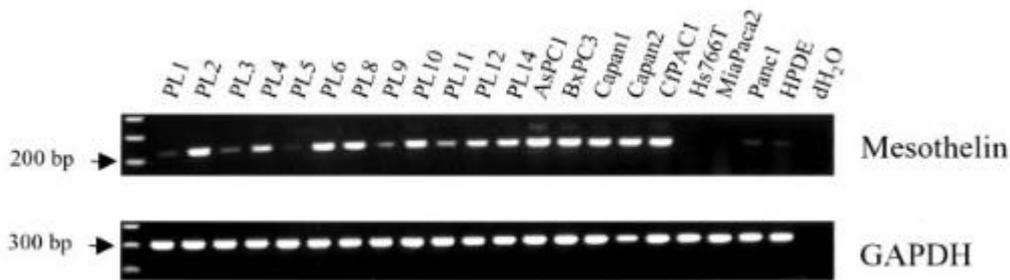


Figure 51. Mesure de l'expression de la MSLN sur des lignées cellulaires de cancers pancréatiques en RT-PCR (Argani et al., 2001).

➤ [Cancer de l'ovaire](#)

Par l'utilisation du clone K1, Chang a pu vérifier que cette cible était également exprimée par plus de 65 % des cancers épithéliaux de l'ovaire (Chang, Pastan, and Willingham, 1992). Un étroit lien entre le cancer ovarien et l'expression de la MSLN a plus récemment été confirmé, avec une expression de la protéine dans 50 à 100 % des cas (Frierson et al., 2003 ; Muminova, Strong, and Shaw, 2004 ; Ordóñez, 2003).

➤ [Cancer du poumon](#)

Bien que les premières études menées avec le clone historique K1 n'aient pas mis en évidence d'expression de la MSLN dans les cancers du poumon, des études menées avec un autre clone, le clone 5B2, ont permis de montrer son expression dans 41 % des cancers du poumon (Ordóñez, 2003). Ces résultats ont été corroborés par les études menées par Miettinen et al., qui concluent à une surexpression dans 53 % des adénocarcinomes pulmonaires (Miettinen and Sarlomo-Rikala, 2003). D'autres études menées par Ho et al. ont montré une expression dans près de 83 % des cancers du poumon étudiés (Ho et al., 2007). De manière intéressante, l'expression de la MSLN dans ces tumeurs est majoritairement intracellulaire.

➤ [Cancer du sein](#)

Il a initialement été constaté une absence d'expression de la MSLN dans les cancers du sein avec seulement une tumeur positive sur les 35 testées par Ordóñez (Ordóñez, 2003). Une expression dans 14 % à 30 % des cancers du sein a par la

suite été rapportée (Frierson et al., 2003 ; L. Wang et al., 2012). Des études ont été menées afin de caractériser l'expression de la MSLN selon le sous-type de cancer du sein (HER2, PR, ER, TN). Ainsi, Vedat Bayoglu et al. ont récemment montré une surexpression de la MSLN dans 43 % des sous-types TN et dans seulement 3,8 % des sous-types HER2 (Bayoglu et al., 2015). Une surexpression dans 67 % des cancers du sein TN, et une expression quasi-absente dans les autres sous-types de cancer du sein a également été rapportée par Tchou et al., qualifiant ainsi la MSLN d'antigène clé des cancers du sein triple négatif (figure 52) (Tchou et al., 2012).

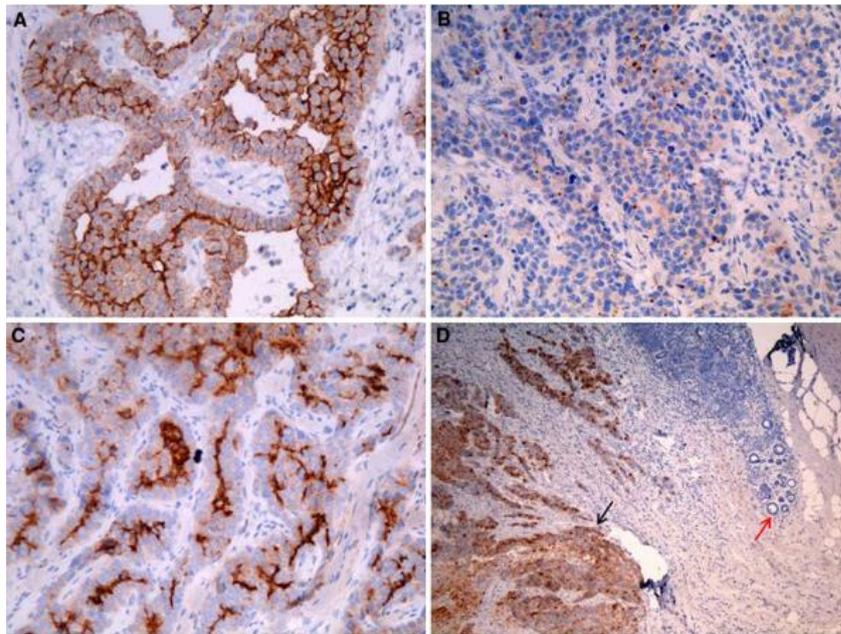


Figure 52. Expression de la MSLN dans les cancers TN. A) Mésothéliome, cancer du sein TN avec B) 5 %, C) 80%, D) 70 % de cellules exprimant la MSLN (flèches noires) et un marquage négatif des tissus sains environnants (flèche rouge) (Tchou et al., 2012).

D'autres études ont récemment rapporté une expression de la MSLN dans plus d'un tiers des cancers du sein TN (Parinyanitikul et al., 2013 ; Tozbikian et al., 2014). Une analyse à plus grande échelle sur 1555 cancers du sein TN a confirmé ce taux, avec une surexpression de la MSLN dans 28 % des cas (Lamberts et al., 2015).

➤ [Autres cancers](#)

L'expression de la MSLN a également été rapportée dans la leucémie aigüe et dans une moindre mesure dans les cancers de la tête et du cou, les cancers

gastriques ou encore du col de l'utérus (Steinbach et al., 2007 ; Dainty et al., 2007 ; Ordóñez, 2003).

Ainsi, la mésothéline est surexprimée par près de 40 % des tumeurs solides et notamment par des cancers agressifs. Cette protéine est en effet surexprimée par plus de 80 % des adénocarcinomes pancréatiques, 85 à 90 % des mésothéliomes, 65 % des cancers ovariens et 60 % des cancers du poumon, mais aussi par 30 à 67 % des cancers du sein triple négatifs (figure 53).

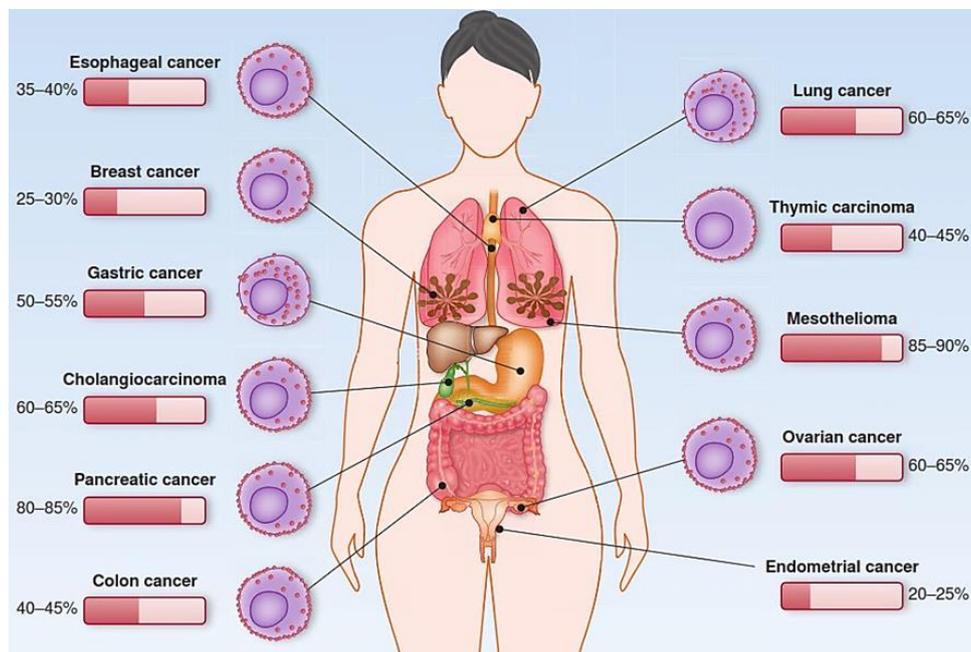


Figure 53. Expression de la MSLN dans différents types de cancers (Hassan et al., 2010).

2.2 Rôle de la mésothéline dans la progression tumorale

La surexpression de la MSLN dans la plupart des cancers suggère qu'elle joue un rôle clé dans les processus de cancérogenèse. Elle semble en effet jouer un rôle important dans la signalisation cellulaire oncogénique et notamment à plusieurs niveaux dans les « Hallmarks of cancer » de Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2011).

➤ Mésothéline et prolifération cellulaire

En premier lieu, Lim et al. ont montré que la surexpression de la MSLN dans des cellules tumorales pancréatiques était associée à une croissance tumorale accrue lors de greffes de ces tumeurs sur des souris immunodéficientes (Li et al., 2008). Cette croissance est à mettre en lien avec des capacités prolifératives que confère la MSLN aux cellules (Bharadwaj et al., 2008). Bharadwaj et al. ont analysé les conséquences de l'expression de la MSLN sur la prolifération et le cycle cellulaire à l'aide de cellules du pancréas Mia-Paca2 transfectées avec la MSLN et par l'utilisation de siRNA sur des cellules BxPC-3 exprimant la MSLN. L'expression de la MSLN augmente considérablement la prolifération de ces cellules et est associée à une transition rapide des cellules vers la phase S de réplication. Cette étude a permis de démontrer l'implication de la MSLN dans l'activation de STAT3, facteur de transcription activé dans 30 % des cancers du pancréas. L'activation de la voie STAT3 par la MSLN résulte en une augmentation de l'expression de la Cycline E et par conséquent du complexe CyclE/CDK2 favorisant la progression dans le cycle cellulaire. Plus récemment, cette même équipe a découvert un autre mécanisme d'action de la MSLN dans l'induction de la prolifération (Bharadwaj et al., 2011). Une plus grande production d'IL-6 chez les cellules transfectées avec la MSLN a été observée. L'inhibition de l'expression de la MSLN et de la voie NF- κ B réduit l'expression d'IL-6 et réduit la prolifération cellulaire, la progression du cycle cellulaire et est à l'origine de l'apoptose de ces cellules. Ces études ont permis de montrer que la MSLN induit l'expression d'IL-6 via NF- κ B, qui agit comme un facteur de croissance nécessaire à la prolifération des cellules tumorales pancréatiques via une signalisation auto et paracrine IL-6/sIL-6R.

➤ Mésothéline et invasion tumorale

Si la MSLN est importante dans la signalisation proliférative, elle l'est également dans l'invasion et la dissémination métastatiques. Son expression dans 86 % des tissus métastatiques de patientes atteintes d'un cancer ovarien a notamment été rapportée (Golfier et al., 2014). Chang a montré dans des modèles de tumeurs de pancréas que l'expression de la MSLN était corrélée à celle de MMP-

7 et que l'inhibition de l'expression de la MSLN inhibe l'invasion et la migration des cellules tumorales de 80 %. Ceci démontre le rôle important de cette protéine dans ces phénomènes (Chang et al., 2012). Il a été montré que l'activation des MMP-7 par la MSLN était liée aux voies de signalisation JNK et ERK, et que les MMP-9 également étaient activées par la MSLN. Servais et al. ont montré que la surexpression de la MSLN induit l'expression de MMP-9 et promeut l'invasion tumorale. Une corrélation entre l'expression de la MSLN et des MMP-9 chez les patients porteurs d'un mésothéliome malin a également été rapportée (Servais et al., 2012). Un mécanisme similaire a été décrit dans les cellules tumorales du sein. En effet, l'expression de la MSLN dans des cellules MCF-7 induit l'expression de MMP-9 et par conséquent l'invasion de ces cellules (Wang et al., 2012). L'inhibition de la voie ERK1/2 diminue l'expression de MMP-9 et l'invasion de ces cellules, confirmant l'implication de cette voie dans la signalisation liée à MSLN.

Comme nous l'avons précédemment évoqué, la progression des tumeurs de stades précoces vers des phénotypes plus agressifs se fait via la TEM. La MSLN serait un acteur majeur de celle-ci puisque son inhibition conduit à une diminution de la migration et de l'invasion cellulaire *in vitro* et à une disparition presque totale des nodules métastatiques *in vivo* (He et al., 2017). Ceci s'expliquerait par le fait que la MSLN régule l'expression de gènes clés de la transition EMT, Slug et le gène de la β -caténine (Kun Wang et al., 2012).

➤ [La mésothéline comme facteur anti-apoptotique](#)

La résistance à la mort cellulaire programmée constitue également une propriété inhérente aux cellules tumorales et apparaît comme étant en partie sous le contrôle de la MSLN. Dans le cancer du sein, Uehara et al. ont montré que la MSLN confère aux cellules tumorales des propriétés de résistance à l'anoïkis, c'est-à-dire l'apoptose entraînée par une perte d'ancrage cellulaire, via la voie MEK1/2 (Uehara, Matsuoka, and Tsubura, 2008). De plus, la MSLN confère aux cellules une résistance à l'apoptose induite par le TNF- α via une activation de la voie Akt/PI3K/NF- κ B (Bharadwaj et al., 2011). La forme soluble de la MSLN, N-ERC, est également impliquée dans la résistance à l'apoptose des cellules tumorales (Hino, 2010).

➤ Mésothéline et résistance à la chimiothérapie

Plus récemment, un lien a été établi entre la résistance à la chimiothérapie et l'expression de la MSLN. L'inhibition de la MSLN *in vitro* dans des lignées de mésothéliomes restaure la sensibilité de ces cellules au Cisplatine (Melaiu et al., 2014). Les données cliniques soutiennent par ailleurs une corrélation étroite entre l'expression de la mésothéline, la résistance à la chimiothérapie et une survie réduite (Cheng et al., 2009).

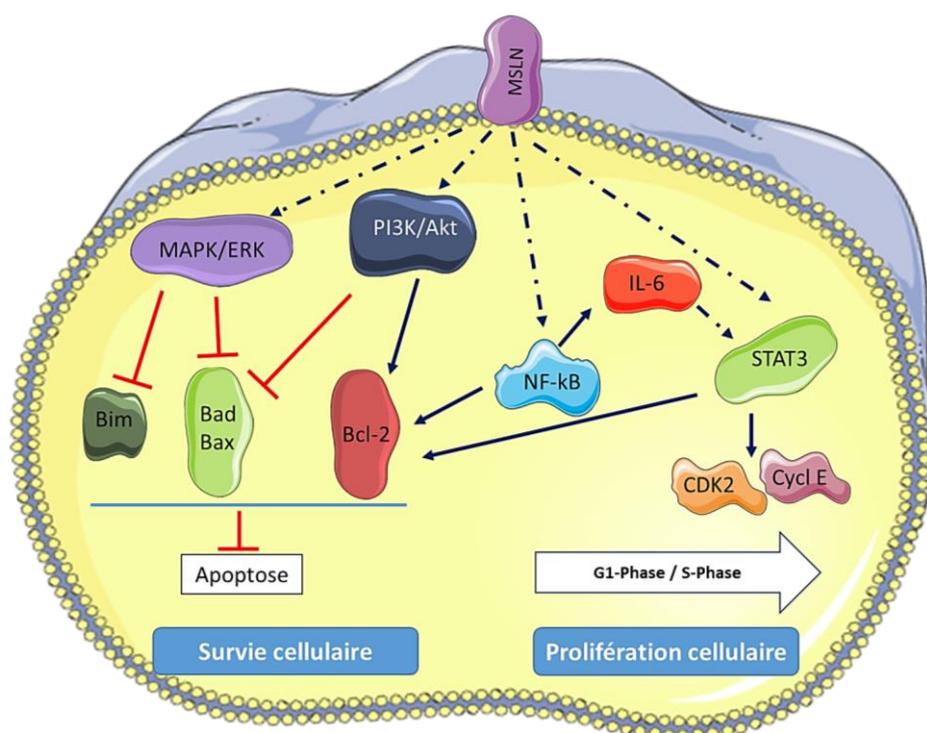


Figure 54. Rôle de la mésothéline dans la survie et la prolifération cellulaire. Schéma récapitulatif du rôle de la mésothéline dans la résistance à l'apoptose, à travers notamment l'activation des voies des MAPK et PI3K/Akt, et dans la prolifération cellulaire (Adapté de Tang et al., 2013).

2.3 Régulation génétique de la MSLN dans les cellules cancéreuses

Un promoteur de la MSLN appelé Canscript, localisé entre -65 et -45 pb avant le site d'initiation de la transcription de la MSLN, a été identifié dans des cancers à haut niveau d'expression de la MSLN (Hucl et al., 2007 ; Ren et al., 2011). L'activité de ce promoteur est augmentée d'un facteur 100 dans les tumeurs. Il est composé de deux motifs : un motif MCAT, conventionnel, et un motif de type SP1-

like. Néanmoins, les facteurs de transcription clés intervenant dans la régulation de l'expression de la MSLN n'ont pas encore été identifiés. Récemment, De Santi et al. ont démontré que l'expression de la MSLN était au moins régulée par un microARN, appelé MiR-21-5p (De Santi et al., 2017).

2.4 Rôle prédictif de l'expression de la MSLN sur le devenir des patients

Au cours de la dernière décennie, des études ont été menées afin d'étudier la corrélation entre le niveau d'expression de la MSLN, déterminée à partir de biopsies tumorales, et le devenir clinique des patients et ce dans différents types tumoraux.

➤ Tumeurs ovariennes

Les niveaux d'expression de l'ARNm codant pour la mésothéline de 139 patientes porteuses d'un cancer épithélial de l'ovaire (EOC) traitées par chimiothérapie ont été évalués (figure 55) (Cheng et al., 2009). De hauts niveaux d'expression de la MSLN corrént avec un stade tumoral avancé et constituent un facteur de mauvais pronostic. Cette étude est cependant en contradiction avec celle de Yen menée 3 ans auparavant dans laquelle l'expression de la MSLN n'est pas associée à une survie prolongée des patientes atteintes de EOC (Yen, 2006).

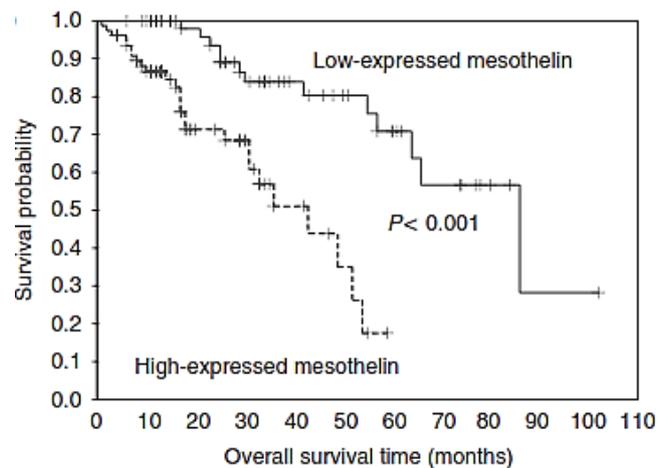


Figure 55. Survie des patients avec un cancer ovarien selon le niveau d'expression de la MSLN (Cheng et al., 2009).

➤ Tumeurs de l'appareil digestif

De nombreuses études ont été menées sur les tumeurs de l'appareil digestif : estomac, pancréas ou encore colon-rectum. La co-expression CA125-MSLN constitue un facteur de mauvais pronostic chez les patients atteints d'un cancer du pancréas (Einama et al., 2011 ; Shimizu et al., 2012). Chez des patients porteurs de tumeurs gastriques traités par chirurgie (n=110), l'expression membranaire de

la MSLN a été démontrée comme étant étroitement corrélée à la présence de métastases ganglionnaires et à une mauvaise survie chez ces patients (Einama et al., 2012). Cette étude est en contradiction avec celle de Baba qui a identifié la mésothéline comme marqueur de bon pronostic dans ces cancers (Baba et al., 2012). Aucune distinction entre la forme cytoplasmique et membranaire n'a cependant été réalisée dans cette étude. La forme membranaire semble donc être celle impliquée dans le pronostic péjoratif des patients. Dans le cancer colorectal (CRC), l'expression de la MSLN est associée à l'invasion lymphatique de la tumeur et à un mauvais pronostic chez les patients avec un cancer métastatique (Kawamata et al., 2014).

➤ Cancer du poumon

L'expression de la MSLN chez les patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC), représentant 85 % des cancers du poumon, constitue un facteur de mauvais pronostic (Kachala et al., 2014 ; Thomas et al., 2015). Ces résultats font de la MSLN un marqueur d'agressivité de ces cancers, avec des métastases plus nombreuses et une survie significativement diminuée par rapport à celle des patients atteints de NSCLC MSLN -.

➤ Cancer du sein

La MSLN semble être un potentiel marqueur pronostique du cancer du sein et notamment du sous-type TN. Dans une étude réalisée à partir de 226 échantillons de cancer TN, une corrélation étroite a été mise en évidence entre l'expression de la mésothéline, la présence de métastases, une rechute précoce et une survie diminuée. (figure 56) (Tozbikian et al., 2014). D'autres études n'ont toutefois pas mis en évidence de corrélation entre l'expression de la MSLN dans les TN et un taux de survie diminué (Parinyanitikul et al., 2013 ; Bayoglu et al., 2015). Cette différence pourrait provenir (i) du seuil utilisé pour la mesure de l'expression de la MSLN et (ii) de la négativité des marqueurs HER2, ER et PR.

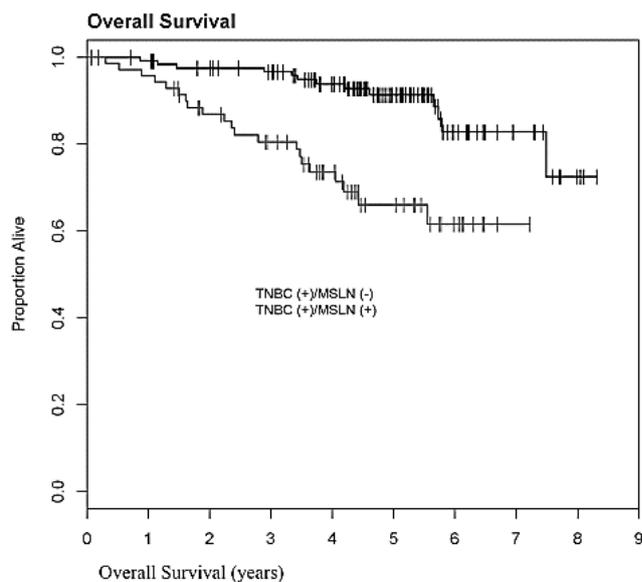


Figure 56. Association entre l'expression de la MSLN et la survie chez des patients avec un cancer du sein TN (Tozbikian et al., 2014).

La valeur pronostique de l'expression de la MSLN dans les différents cancers est résumée dans le tableau 5.

Tumeur	Corrélation MSLN-Pronostic	Références
PDAC	Mauvais pronostic	Einama et al., 2010 Shimizu et al., 2011
Gastrique	Contradictoire	Einama et al., 2015 Baba et al., 2012
Colorectal	Mauvais pronostic	Kawamata et al., 2014
Cancer du sein TN	Mauvais pronostic Contradictoire	Wang et al., 2012 Tozbikian et al., 2014 Parinyanitikul et al., 2013 Bayoglu et al., 2015
Cancer ovarien	Contradictoire	Yen et al., 2006 Chen et al., 2009
Poumon (NSCLC)	Mauvais pronostic	Thomas et al., 2015 Kachala et al., 2014

Tableau 5. Association entre l'expression de la MSLN et le pronostic des patients dans différents types de cancers.

2.5 Dosage de la MSLN soluble en cancérologie

L'identification de marqueurs sanguins et le développement de tests permettant de les détecter représentent des enjeux majeurs en oncologie. De tels marqueurs pourraient être utiles (1) pour permettre d'établir un diagnostic précoce et (2) pour évaluer l'efficacité thérapeutique d'un agent anti-cancéreux. Deux formes solubles de la MSLN ont été identifiées : le MPF (32-kDa) et la forme à 40-kDa appelée SMRP pour Serum Mesothelin Related Peptide. Si le MPF est relargué suite à l'action d'une protéase de type furine, les mécanismes d'induction et de sécrétion du peptide SMRP ne sont pas encore pleinement décrits. Deux hypothèses ont été émises pour expliquer ce phénomène, à savoir l'implication de protéases combinée à la présence de variants transcriptionnels de la mésothéline (Scholler et al., 1999 ; Hellstrom, 2006 ; Zhang et al., 2011).

➤ Intérêt diagnostique du dosage de SMRP

L'intérêt diagnostique du dosage de la MSLN soluble a été évalué dans plusieurs études et notamment dans le cancer de l'ovaire et le mésothéliome. D'importants niveaux de SMRP ont été retrouvés dans le sang de 75 % des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire (EOC) (Wu et al., 2014 ; Scholler et al., 1999). Dans le but de détecter plus précocement les cancers de l'ovaire, l'intérêt d'une co-détection de CA125, marqueur validé du cancer de l'ovaire, avec SMRP a été étudié chez des patientes avec un EOC. Il a pu être montré une plus grande sensibilité de la co-détection (87 %) en comparaison des détections de CA125 (78 %) ou SMRP seul (60 %) (McIntosh et al., 2004). En revanche, une telle co-détection n'améliore pas la sensibilité du diagnostic du

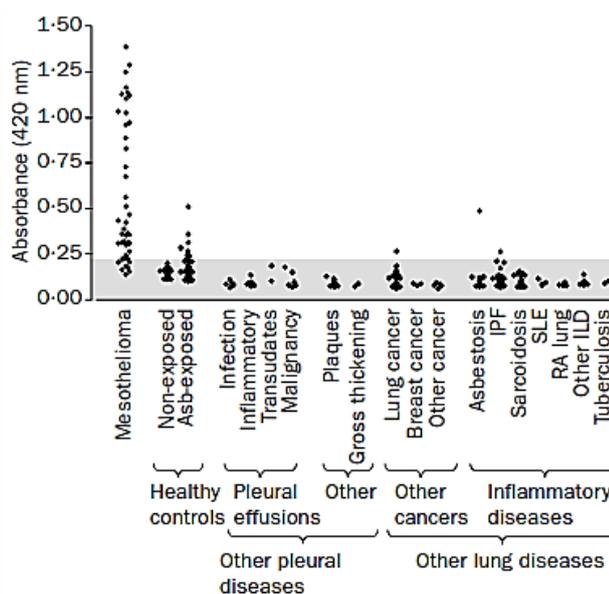


Figure 57. Concentration sérique de SMRP dans le mésothéliome et d'autres pathologies cancéreuses ou non (Robinson et al., 2005).

mésotéliome malin (Creaney et al., 2007). Robinson et al. ont montré que le SMRP seul est un marqueur sensible et spécifique du mésotéliome malin (figure 57) (Robinson et al., 2005).

Devant le potentiel diagnostique du dosage de la MSLN soluble dans le mésotéliome, un kit de dosage a été développé : Mesomark®. Cependant, de hauts niveaux de SMRP ont été détectés en conditions non tumorales (hypertension, dysfonction rénale) ce qui restreint l'intérêt de son utilisation (Beyer et al., 2007). De manière intéressante, il n'a pas pu être mis en évidence d'augmentation de la concentration de SMRP dans le sérum de patients atteints de PDAC ou d'un cancer biliaire par comparaison aux pathologies bénignes de cet organe et cela malgré la surexpression de la forme membranaire de la MSLN dans la quasi-totalité de ces tumeurs (Sharon et al., 2012 ; Johnston et al., 2009).

➤ Marqueur prédictif de la réponse à une thérapie et valeur pronostique ?

Des études ont également été réalisées afin d'évaluer le dosage du SMRP comme marqueur de suivi de l'efficacité d'une thérapie. Dans ce cadre-là, Grigoriu et al. ont montré que les patients atteints de mésotéliomes malins répondant à la chimiothérapie présentaient de faibles niveaux de SMRP par comparaison à ceux ne répondant pas à cette thérapie (Grigoriu et al., 2007). Le SMRP pourrait alors constituer un marqueur prédictif de la réponse à la chimiothérapie. Le dosage du SMRP semble être pronostique de la survie des patients atteints de cette pathologie (Grigoriu et al., 2007 ; Grigoriu et al., 2009).

2.6 Ciblage thérapeutique de la mésothéline

La très faible expression de la MSLN à l'état physiologique et sa surexpression dans la plupart des cancers en font une cible pertinente pour les thérapies. De plus, des anticorps anti-MSLN sont fréquemment retrouvés dans le sang des patients atteints d'un mésotéliome ou d'un cancer ovarien, faisant de la MSLN une protéine immunogénique (Ho et al., 2005). Plusieurs stratégies ont été mises au point pour cibler la MSLN : des anticorps monoclonaux couplés ou non à des toxines protéiques (SS1P, LMB-100), ou à d'autres agents cytotoxiques

(Antibody-Drug-Conjugate ou ADC), ainsi que des cellules T chimères (CAR-T-cells) contenant un Fv spécifique de la MSLN. Une autre approche concerne les vaccins pouvant induire une réponse immunitaire des lymphocytes T contre la MSLN (Morello, Sadelain, and Adusumilli, 2016 ; Hassan et al., 2016).

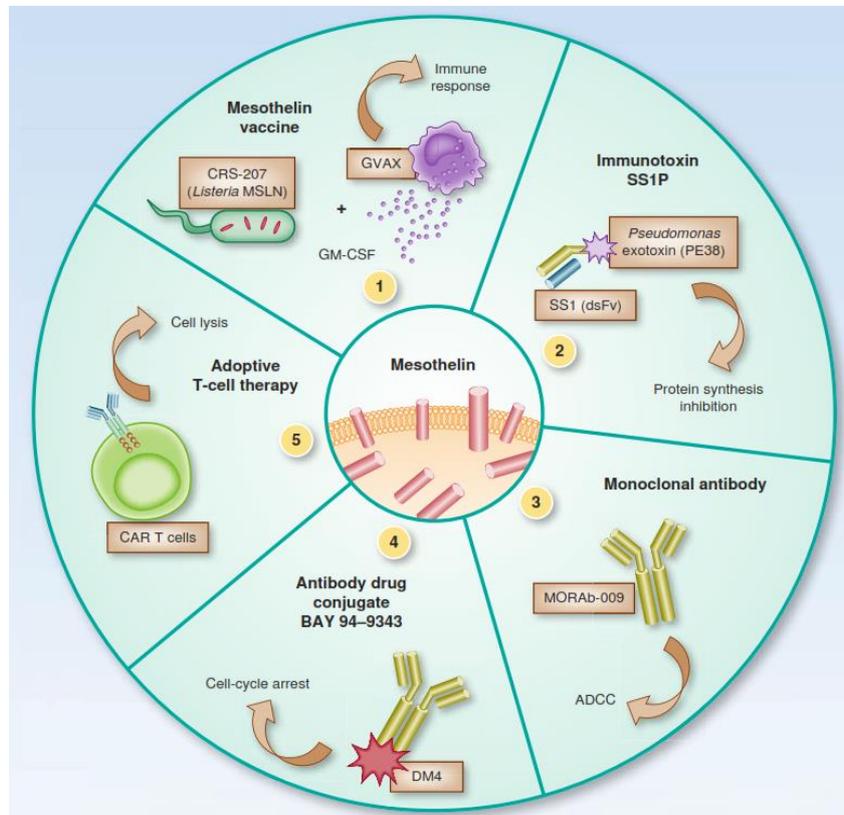


Figure 58. Thérapies ciblant la MSLN en cours de développement (Morello et al., 2016).

➤ Les immunotoxines

Les immunotoxines sont des protéines formées de l'assemblage d'un anticorps et d'une toxine. Lorsque ces anticorps se lient à une cellule exprimant leur cible, ils pénètrent dans la cellule et induisent sa mort (Pastan et al., 2007). De nombreux essais cliniques à l'aide de ces agents ont vu le jour depuis une dizaine d'années (Pastan et al., 2006).

- SS1P

SS1P consiste en un fragment variable (scFv) anti-MSLN couplé à une toxine issue de *Pseudomonas* (exotoxine A, PE) (Chowdhury et al., 1998). SS1P se fixe sur les cellules exprimant la MSLN puis est internalisée, la toxine est alors libérée dans le cytosol. Elle induit par la suite l'apoptose des cellules tumorales en

inhibant la synthèse protéique après liaison irréversible à EF2 ou Elongation Factor-2 (Pastan et al., 2006). Cet effet anti-tumoral a pu être démontré sur des cellules tumorales gynécologiques et de mésothéliomes issues de patients (Hassan et al., 2002 ; Li et al., 2004). Dans des modèles pré-cliniques de tumeurs exprimant la MSLN, l'effet anti-tumoral de SS1P en association ou non avec de la radiothérapie et des agents chimiothérapeutiques a été largement démontrée (Hassan, 2006 ; Mossoba et al., 2011 ; Zhang et al., 2007 ; Fan et al., 2002). Devant ces données encourageantes, des phases cliniques ont démarré avec cet agent, seul ou en combinaison avec une chimiothérapie (Hassan et al., 2007 ; Hassan et al., 2014 ; Kreitman et al., 2009). L'efficacité de SS1P a cependant été limitée par la formation d'anticorps neutralisants dirigés contre une séquence protéique de l'exotoxine chez 88 % des patients. Afin d'augmenter l'efficacité de SS1P, il a été injecté en combinaison à la cyclophosphamide et la pentostatine. Du fait du potentiel leucopéniant de ces agents, cette combinaison a permis de retarder le développement d'anticorps neutralisants chez les patients (figure 59). Une réponse partielle chez 10 des 13 patients avec un mésothéliome métastatique a été observée (diminution de volume d'au moins 30 % de la somme des lésions cibles) (Hassan et al., 2014). Devant l'efficacité anti-tumorale de ce traitement, une phase II a récemment été initiée chez des patients porteurs d'un cancer pancréatique (NCT01362790).

- RG7787/LMB-100

Afin de limiter la formation d'anticorps neutralisants, une deuxième stratégie basée sur la modification de la séquence de SS1P a été effectuée. RG7787/LMB-100, une immunotoxine recombinante dirigée contre la MSLN, a récemment été développée. Il s'agit d'un fragment Fab avec une nouvelle endotoxine (PE24), moins immunogénique que SS1P, dont l'activité anti-tumorale a pu être démontrée dans des modèles pré-cliniques de divers cancers solides (Alewine et al., 2014 ; Hollevoet et al., 2014 ; Hassan, Alewine, and Pastan, 2016). Un essai clinique avec LMB-100 a récemment débuté pour le traitement de patients avec des mésothéliomes et des cancers pancréatiques (NCT02810418).

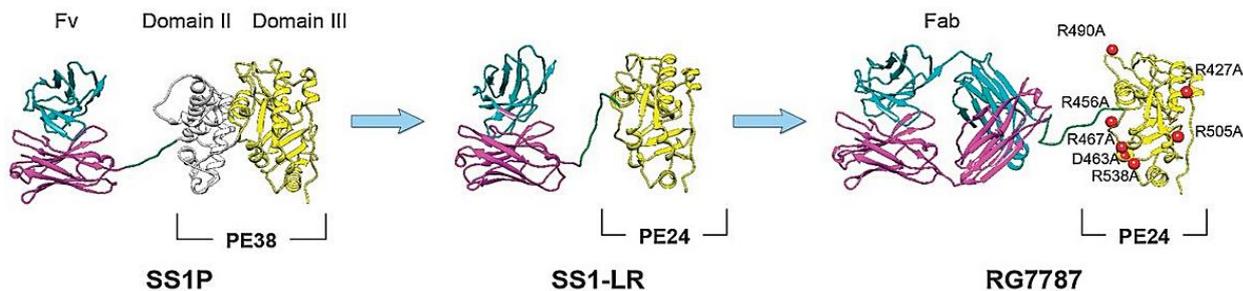


Figure 60. Modification de la séquence de SS1P pour limiter la réponse anti-SS1P. Des modélisations structurales sont montrées ici. Le domaine II n'étant pas nécessaire à l'activité cytotoxique de la toxine, il a été délété (PE24). Des mutations ont été introduites dans la séquence de PE24 afin d'éliminer les épitopes des cellules B humaines. RGG7787 est constitué d'un Fab combiné à PE24 (haut poids moléculaire) ce qui augmente la demi-vie biologique de la molécule (Hassan et al., 2016).

➤ Les anticorps monoclonaux

Hassan R et son équipe ont produit un anticorps monoclonal, MORAB-009 (Amatuximab). Cet anticorps entraîne la mort cellulaire par le mécanisme ADCC (Antibody-Dependant Cell-mediated Cytotoxicity) (figure 61). Si l'utilisation de l'Amatuximab seul ne montre qu'un effet limité *in vivo*, sa combinaison avec un agent chimiothérapeutique augmente son efficacité (Hassan et al., 2007). Sur la base de l'innocuité de ce traitement en phase I, une phase II a été menée chez des patients atteints de mésothéliome. Quarante-neuf patients ont été traités avec du Pémétrexed et du Cisplatine à J 1 pendant 3 semaines, sur 6 cycles. L'Amatuximab a été administré aux jours 1 et 8 de chaque cycle. La survie globale des patients a été montrée comme étant supérieure à celle des contrôles historiques traités avec Pémétrexed + Cisplatine (Hassan et al, 2014). Suite à ces résultats, une étude clinique randomisée de phase II a démarré en 2015 (NCT02357147).

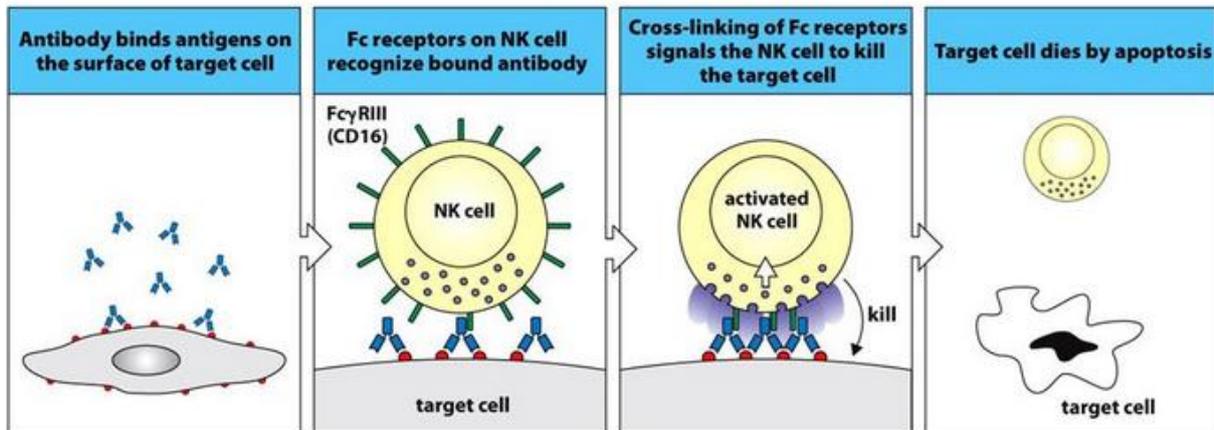


Figure 61. Mécanisme de lyse cellulaire par ADCC. Le mécanisme ADCC fait intervenir des anticorps qui se fixent sur un antigène situé à la surface des cellules d'intérêt. Des cellules immunitaires (Natural Killers) reconnaissent le fragment constant des IgG et libèrent des facteurs cytotoxiques (granzymes) entraînant la lyse des cellules cibles.

➤ Les anticorps couplés à une drogue (ADC)

Les Antibody-Drug-Conjugate (ADC) combinent la spécificité d'un anticorps avec le pouvoir cytotoxique d'un agent chimiothérapeutique (figure 62). L'Anetumab ravtansine (BAY 94-9343) est un anticorps anti-MSLN couplé à une drogue ciblant les microtubules, le DM4 (Maytansinoid). Les études pré-cliniques ont démontré le potentiel de cet agent pour cibler sélectivement les tumeurs exprimant la MSLN et à inhiber leur croissance (Golfier et al., 2014). Cet agent a été évalué chez des patients avec mésothéliomes (Hassan et al., 2016). Il a montré des effets secondaires réversibles à haute dose (neuropathie périphérique). L'utilisation de cet agent en deuxième ligne de traitement a conduit à 50 % de réponses objectives (diminution de volume d'au moins 30 % de la somme des lésions cibles) (n=10). Ces résultats ont conduit à la mise en place d'une phase II chez des patients avec mésothéliomes en deuxième ligne de traitement (NCT02610140).

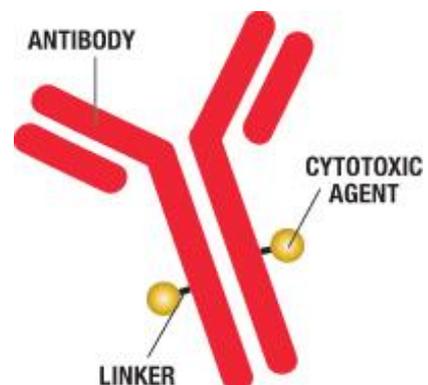


Figure 62. Anticorps couplé à une drogue.

Un autre ADC est actuellement à l'essai. Il s'agit du DMOT4039A, un anti-MSLN conjugué à un agent anti-mitotique (MMAE). La phase I menée sur des patients atteints d'un cancer pancréatique ou ovarien a permis de démontrer la tolérance de ce traitement (Weekes et al., 2016). Il a pu être observé une réponse partielle chez 2 des 26 patients avec un cancer pancréatique. Le statut MSLN de ces tumeurs n'a cependant pas été déterminé.

➤ Les vaccins

L'équipe d'Elizabeth Jaffee a été la première à identifier la MSLN comme une cible des lymphocytes CD8+, en utilisant le vaccin GVAX (figure 63) (Le et al., 2015). Il s'agit d'un vaccin réalisé à partir de cellules tumorales pancréatiques, modifiées pour produire le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), une cytokine à l'origine de la différenciation des monocytes en macrophages et en cellules dendritiques. Le GVAX a été évalué chez des patients atteints d'adénocarcinomes pancréatiques. Ce vaccin entraîne une réponse des lymphocytes T contre de nombreux antigènes dont la mésothéline. De plus, il existe une corrélation entre la réponse T anti-MSLN et la survie chez ces patients (Eric et al., 2011 ; Beatty et al., 2014 ; Thomas et al., 2004 ; Laheru et al., 2008).

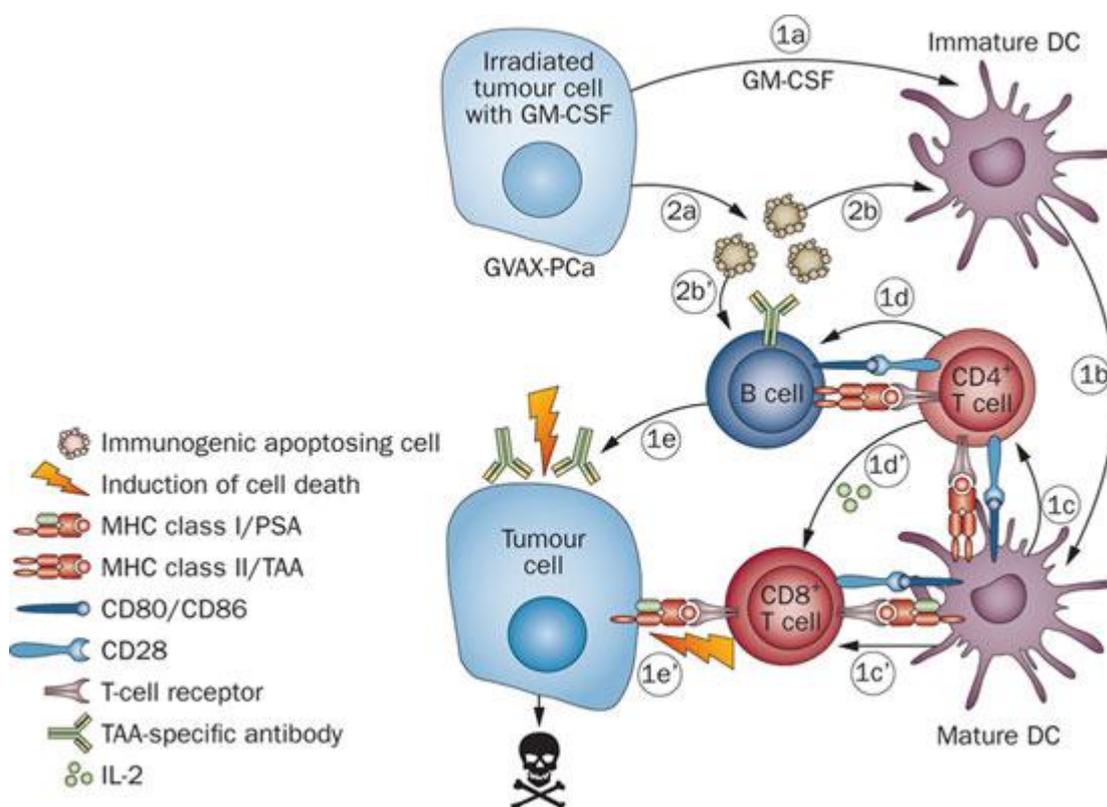


Figure 63. Mécanisme d'action proposé du GVAX. Des cellules tumorales sont irradiées et modifiées pour sécréter le GM-CSF, une chimiokine attirant les cellules présentatrices d'antigènes, les cellules dendritiques (CD) immatures (1a), et induisant leur maturation (1b). Des corps apoptotiques sont produits par les cellules tumorales (GVAX-PCa) (2a) et sont captés par les CD (2b) et les lymphocytes B (2b'). Les CD matures activent les LT CD4+ (1c) et CD8+ (1c'). Ces LT CD4+ activés vont ensuite stimuler l'activation des lymphocytes B (1d). Les LB produisent alors des anticorps anti-TAA (Tumor Associated-Antigen). Ceci résulte en une mort cellulaire par ADCC (1e) ou par les CD8+ (1e') (Geary et al., 2013).

Un vaccin dirigé contre la mésothéline, le CRS-207, a récemment été développé. Il a été produit à partir de la bactérie atténuée *Listeria Monocytogenes* (LM), modifiée pour sécréter la MSLN dans le cytosol des cellules présentatrices d'antigène. Ce vecteur a été délété de deux gènes impliqués dans la virulence de la bactérie, et modifié pour exprimer la MSLN humaine (figure 64) (Brockstedt et al., 2004). Chez l'homme, il a pu être démontré l'innocuité de ce traitement lors d'une étude de phase I, ainsi qu'une réponse immunitaire avec la détection de lymphocytes T CD8+ anti-MSLN chez 37 % des patients (n=17) (Le et al., 2012).

La combinaison du GVAX et du CRS-207 a été évaluée chez 90 patients atteints de PDAC métastatique (Le et al., 2015). Une survie globale améliorée a été observée chez les patients traités avec la combinaison des 2 vaccins en comparaison de ceux traités avec le GVAX seul (6,1 mois vs 3,9 mois, $p = 0,02$). Une étude de phase II est en cours concernant l'utilisation du GVAX/CRS-207 avec un inhibiteur de PD-1 (programmed cell death 1) chez des patients présentant un PDAC métastatique (NCT02243371).

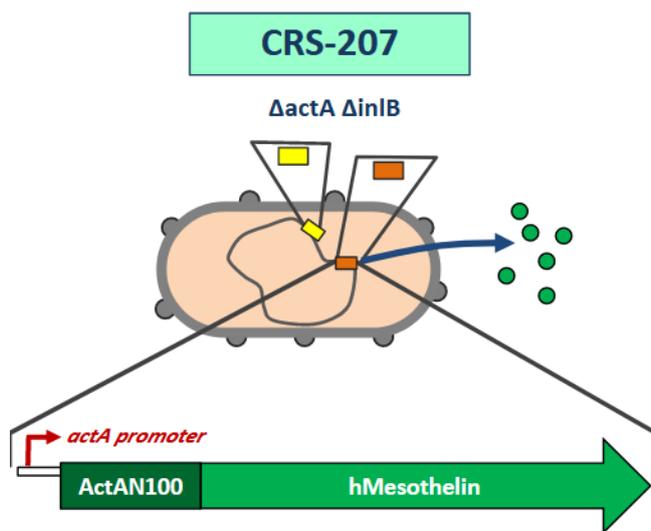


Figure 64. Schéma de CRS-207. La bactérie *Listeria Monocytogenes* a été déléetée de 2 gènes de virulence (ActA et inIB) et modifiée pour exprimer la mésothéline humaine.

➤ Les « CAR-T cells » ou cellules CAR-T

Parmi les immunothérapies, la thérapie par lymphocytes T à récepteur antigénique chimérique (CAR-T) constitue l'une des approches novatrices les plus prometteuses pour le traitement des cancers. Il s'agit d'une immunothérapie qui utilise les cellules immunitaires du patient (LT) pour reconnaître et attaquer spécifiquement les cellules tumorales. Elle consiste à prélever les LT dans le sang du patient et à les modifier *in vitro* de manière à ce qu'elles expriment un récepteur artificiel en surface, spécifique d'un antigène. Ce récepteur permet aux LT génétiquement modifiés de traquer et d'attaquer les cellules cancéreuses. Ces récepteurs portent le nom de « récepteurs antigéniques chimériques » (CAR). Les cellules CAR-T sont ensuite multipliées au laboratoire, puis injectées au patient par voie intraveineuse (figure 65).

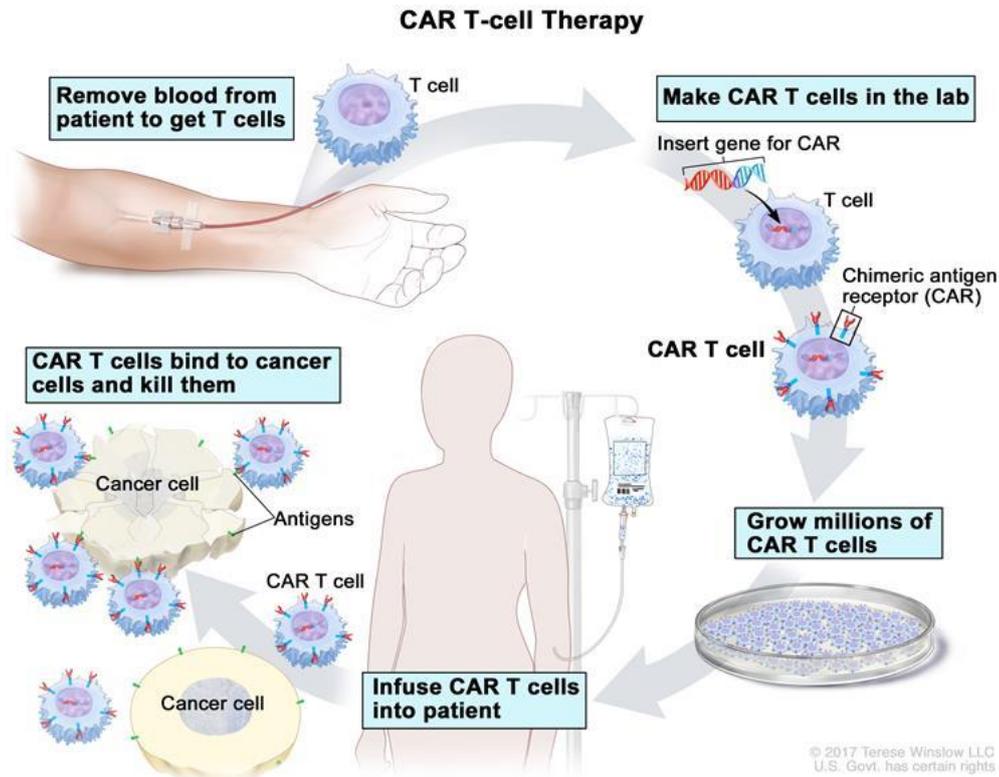
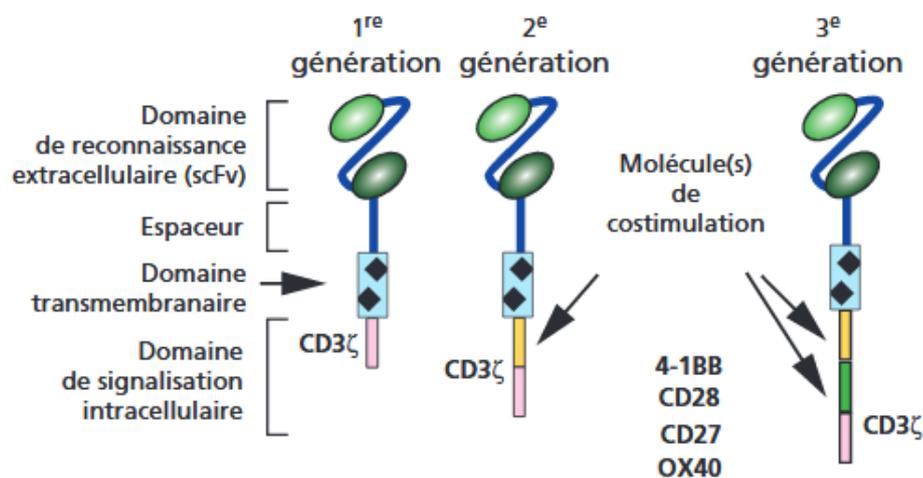


Figure 65. L'approche « CAR-T cells » pour le traitement des cancers. Les cellules T sont prélevées et modifiées pour exprimer un récepteur T dirigé contre un antigène tumoral. Après multiplication des LT, ils sont réinjectés au patient (National Cancer Institute).

L'équipe d'Eshhar a été la première à utiliser la technologie « CAR-T-cells » en 1989 (Gross, Waks, and Eshhar, 1989). Ces cellules CAR-T de première génération étaient constituées du domaine extracellulaire de liaison à l'antigène (scFv) et d'un domaine CD3 en intracellulaire, domaine clé d'activation des LT. Cependant, ces CAR-T-cells n'ont eu qu'un impact clinique limité dans le traitement de différents cancers (Till et al., 2008). Des CAR-T cells de 2^{ème} génération ont par la suite été développées. Elles possèdent 1 domaine de co-stimulation, à l'origine d'une augmentation des capacités cytotoxiques et de persistance des LT *in vivo* (Galaine and Borg. 2017). Cette nouvelle approche thérapeutique a permis d'augmenter la survie de patients atteints d'une leucémie lymphoblastique aiguë (Maude et al., 2014 ; Lee et al., 2015). Une troisième génération de CAR-T cells a ensuite vu le jour. Les cellules sont constituées de 2 domaines de co-stimulation. Ces CAR-T cells possèdent une cytotoxicité anti-

tumorale augmentée par rapport à leurs prédécesseurs et entraînent une réponse anti-tumorale durable chez le petit animal (Zhong et al., 2010 ; Till et al., 2012). Cependant, les données cliniques sont encore limitées. Une quatrième génération de CAR-T cells a récemment été développée. Ces cellules s'apparentent aux CAR-T cells de 2^{ème} génération mais possèdent en plus une cassette d'expression génique (IL-12) induite par le récepteur T. La sécrétion de l'IL-12 par les CAR-T cells permet notamment l'activation des Natural Killer et une augmentation de l'activité anti-tumorale de ces cellules (Smith et al., 2016).



	Pas de molécule de costimulation	1 molécule de costimulation	2 molécules de costimulation
Cytotoxicité	±	+	++
Prolifération	±	+	++
Sécrétion de cytokines	±	+	++
Résistance	±	+	++
Persistance <i>in vivo</i>	±	+	++

Figure 66. Les trois générations de récepteur antigénique chimérique (CAR). La 1^{ère} génération est composée de la région variable à simple chaîne (scFv) liée à la chaîne CD3 intracellulaire. Le CAR de 2^{ème} génération contient un domaine de signalisation intracellulaire dérivé d'une molécule de co-stimulation des LT suivi par la chaîne CD3. Le CAR de 3^{ème} génération comprend deux molécules de co-stimulation associées à la chaîne CD3 (Galaine and Borg, 2017).

Plus de 100 essais cliniques ont ainsi été menés à l'aide de ces outils. Plus de 50 % d'entre eux concernent les hémopathies malignes et notamment le

récepteur CD19. La première thérapie CAR-T (Kymriah™, Novartis) a récemment été approuvée par la FDA (2018) pour le traitement des leucémies lymphoblastiques aiguës (CD19+) réfractaires, après qu'elle ait induit une rémission complète de la maladie chez 81 % de patients à 3 mois (n=75) et une persistance des CAR-T cells dans le sang à 1 an après une seule infusion (Maude et al., 2018). Ces thérapies ne sont cependant pas dénuées d'effets secondaires. Ils comprennent notamment un syndrome de relargage des cytokines (hypotension, insuffisance respiratoire) constituant une urgence médicale. Le Tocilizumab (anti-IL-6) a récemment été approuvé pour la prise en charge de ce syndrome (Le et al., 2018).

Des CAR-T cells dirigées contre la MSLN ont également été développées. D'importantes activités anti-tumorales de ces agents ont pu être observées dans des modèles murins de cancers ovariens, pulmonaires et de mésothéliomes (Carpenito et al., 2009 ; Adusumilli et al., 2014). L'injection régionale de CAR-T cells anti-MSLN a notamment pu conduire à une éradication tumorale, avec une persistance de cellules T fonctionnelles plus de 200 jours après le traitement. Sur la base de ces résultats, une étude de phase I avec une injection intrapleurale de CAR-T cells anti-MSLN chez des patients atteints d'un mésothéliome a débuté (NCT02414269). D'autres études cliniques sont en cours de réalisation et une première étude de phase I a permis de démontrer la tolérance d'injections répétées des CAR-T cells anti-MSLN chez 4 patients atteints de mésothéliome ou PDAC, sans effet sur les tissus exprimant la MSLN. Cependant, les réponses anti-tumorales observées étaient modérées (Beatty et al., 2014).

Si les stratégies CAR-T cells semblent être prometteuses, elles peuvent être associées à de graves effets secondaires, tels que le syndrome du relargage des cytokines, le syndrome de lyse tumorale ou encore un choc anaphylactique. Pour éviter ces complications, il a récemment été inclus un gène suicide pro-apoptotique (iCaspase9) qui peut être déclenché à tout moment par l'ajout d'une drogue (AP1903). Les suicides des CAR-T cells anti-MSLN ont pu être induits par ce système et pourraient constituer une approche intéressante pour augmenter la tolérance des CAR-T cells (Morello, Sadelain, and Adusumilli, 2016). D'autres

phases cliniques chez des patients atteints de PDAC, mésothéliomes, cancers ovariens ou cancers du sein métastatiques sont en cours (NCT01583686, NCT02159716, NCT01897415, NCT01355965, NCT02792114).

De grands progrès ont été réalisés dans le développement d'approches thérapeutiques ciblant la MSLN. Bien qu'une toxicité péricardique ait été crainte du fait de l'expression physiologique de la MSLN par les cellules mésothéliales du péricarde, elle n'a pas été observée pour la plupart des traitements évalués. Comme les thérapies ciblant la MSLN en combinaison avec des agents chimio- ou immuno-thérapeutiques ne montrent pas d'effet toxique supplémentaire, d'autres essais cliniques ont été initiés (Anetumab Ravtansine et un inhibiteur de PD-1 (NCT03455556)).

Le développement de marqueurs compagnons ciblant la MSLN permettrait de sélectionner les patients susceptibles de bénéficier de ces nouvelles thérapies, et d'évaluer leur efficacité. Outre l'amélioration de la prise en charge des patients, un tel outil permettrait également de rationaliser les coûts engendrés par ces nouveaux traitements qui sont considérables (Anticorps, CART-T cells).

2.7 Agents d'imagerie ciblant la MSLN

Si à l'heure actuelle aucun agent d'imagerie ciblant la mésothéline n'est disponible en routine clinique, des études pré-cliniques et cliniques ont été menées afin d'analyser la biodistribution de traceurs ciblant cette protéine. Toutes les études réalisées jusqu'à ce jour ont été réalisées à l'aide d'anticorps monoclonaux. Différents clones d'anticorps entiers ont été radiomarqués à l'Indium 111 pour l'imagerie TEMP, ainsi qu'au Cuivre 64 et au Zirconium 89 pour l'imagerie TEP.

- Imagerie TEMP : études pré-cliniques et cliniques à ^{111}In

R. Hassan a été le premier à réaliser le radiomarquage du clone K1, qui a été à l'origine de la découverte de la MSLN, à l'indium 111 (^{111}In) et à étudier sa

biodistribution *in vivo* chez des souris porteuses de tumeurs ovariennes (figure 67) (Hassan et al., 1999). Les études de biodistribution réalisées de 24 à 168 h post-injection ont permis de démontrer la spécificité de liaison de $^{111}\text{In-K1}$ *in vivo* aux tumeurs exprimant la mésothéline, cependant le rapport entre l'activité tumorale et l'activité sanguine n'était optimal qu'à partir de 48 h post injection.

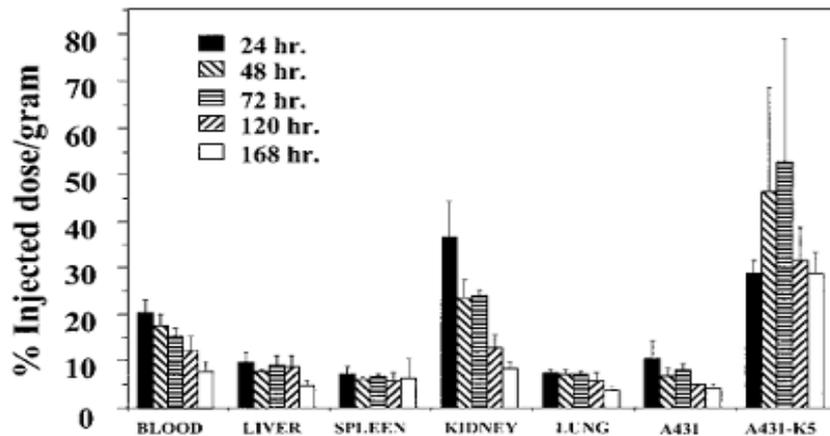


Figure 67. Biodistribution de $^{111}\text{In-K1}$ chez des souris porteuses de tumeurs exprimant la MSLN (A431-K5) et ne l'exprimant pas (A431). Une biodistribution par prélèvements d'organes a été effectuée à différents temps après l'injection du radiotracer (Hassan et al., 1999).

Un autre clone spécifique de la MSLN a également été radiomarqué à l'Indium 111, il s'agit du clone MB (Misri et al., 2011). Comme le clone K1, $^{111}\text{In-mAbMB}$ se fixe spécifiquement aux tumeurs exprimant sa cible *in vivo*, mais il faut attendre 48 à 72 h pour obtenir des rapports tumeur / bruit de fond (TBR) exploitables. Sur les imageries TEMP ci-contre, une fixation des clones K1 et MB est visible dans les tumeurs A431K5 exprimant la mésothéline et non dans les tumeurs A431 ne l'exprimant pas. On note une importante fixation des deux clones dans le foie pour l'un, et la rate pour l'autre (figure 68).

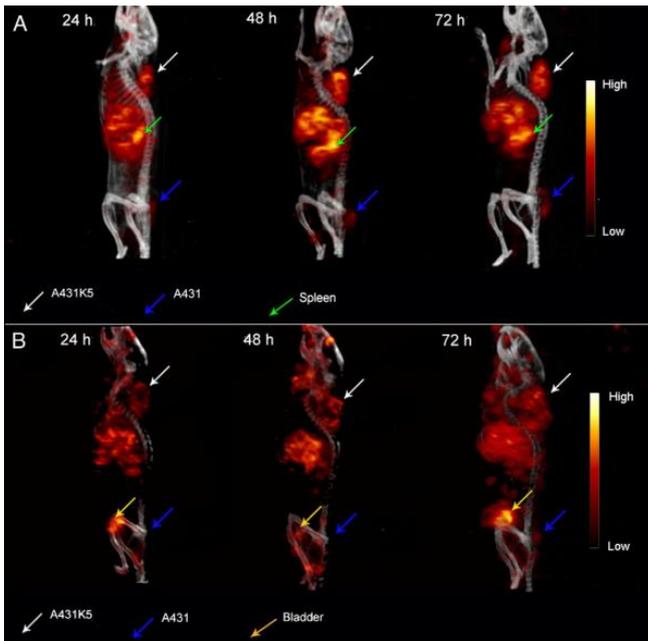


Figure 68. Images fusionnées TEMP/TDM de souris SCID porteuses de tumeurs A431K5 et A431. Les souris ont été injectées avec ^{111}In -mAbMB (A) ou ^{111}In -mAbK1 (B) et l'imagerie a été réalisée 24, 48 et 72h après l'injection. (Misri et al., 2011).

Des investigations cliniques ont été menées avec l' ^{111}In -Amatuximab chez des patients (n=7) présentant un adénocarcinome pancréatique ou un mésothéliome (figure 69) (Lindenberg et al., 2015). Des imageries TEMP ont été réalisées à différents temps (2-4 h, 24-48 h et 96-168 h) après l'injection d' ^{111}In -Amatuximab. L'anticorps se distribue principalement dans le foie, les reins et la rate. Concernant le ciblage des tumeurs, il est possible de les visualiser chez 4 des 6 patients avec un TBR optimal entre 96 et 168 h.

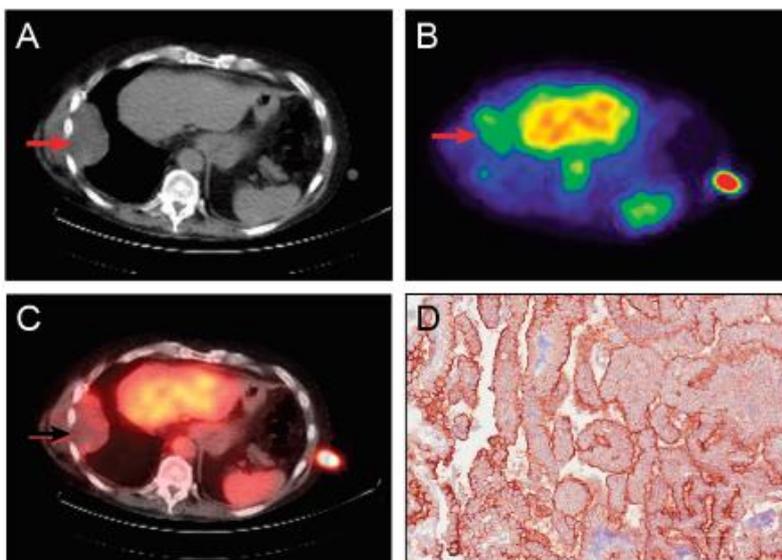


Figure 69. Image représentative montrant la localisation tumorale d' ^{111}In -Amatuximab et l'expression tumorale de la MSLN chez un patient présentant un mésothéliome. (A) TDM, (B) TEMP, (C) Fusion TEMP-TDM à 24 h post-injection. La fixation tumorale du radiotraceur est indiquée par la flèche rouge (Lindenberg et al., 2015).

➤ Imagerie TEP : études pré-cliniques et cliniques avec des molécules marquées au ^{89}Zr et au ^{64}Cu

Des traceurs ciblant la mésothéline ont également été développés et évalués pour l'imagerie TEP. Le clone 11-25, un mAb murin, a récemment été radiomarqué au ^{64}Cu et évalué sur des modèles murins porteurs de tumeurs pancréatiques (Kobayashi et al., 2015). Sur les images TEP présentées ci-dessous, la fixation de ^{64}Cu -11-25 est plus importante dans les tumeurs exprimant la cible (figure 70) que dans les tumeurs ne l'exprimant pas. Cependant, les rapports de fixation tumeur / sang établis par prélèvements d'organes ne dépassent pas la valeur de un, 48 h après l'injection du radiotracer.

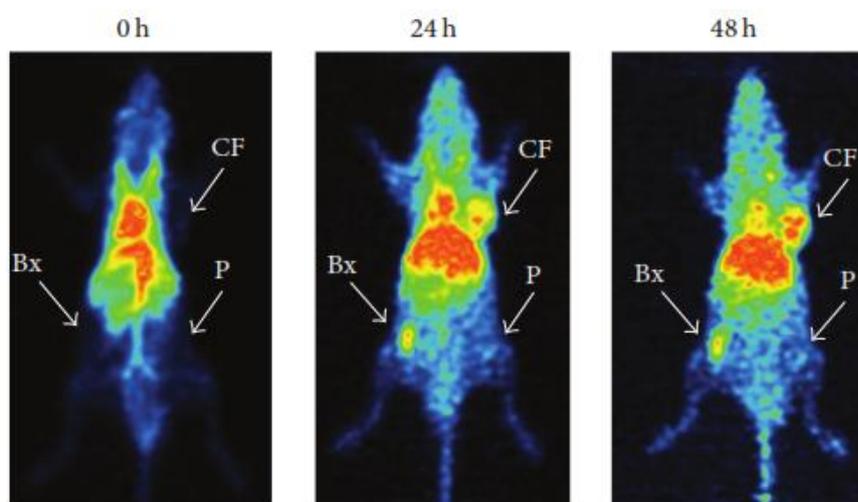


Figure 70. Imagerie TEP de souris porteuses de tumeurs MSLN+ (CFPAC-1, BxPC-3) et MSLN-PANC-1. Les images ont été réalisées à 0, 24 puis 48 h après l'injection de ^{64}Cu -11-25 (Kobayashi et al., 2015).

Récemment un anticorps entier a été radiomarqué au ^{89}Zr et a fait l'objet d'investigations pré-cliniques et cliniques (Lamberts et al., 2016). Il s'agit du MMOT0530A, l'anticorps monoclonal à la base de l'immuno-conjugué DMOT4039A actuellement en essai clinique. ^{89}Zr -MMOT0530A a été évalué dans des modèles de xénogreffes de tumeurs humaines avec des niveaux variables d'expression de la mésothéline, et il a pu être montré que la réponse au traitement (DMOT4039A) des souris porteuses de tumeurs était corrélée à la fixation du traceur ^{89}Zr -MMOT0530A dans les tumeurs (Terwisscha van Scheltinga et al., 2017). En plus du potentiel de ^{89}Zr -MMOT0530A comme marqueur phénotypique, cette étude

suggère que l'imagerie de la MSLN pourrait être un outil prédictif de la réponse à un traitement ciblant cette protéine. Cependant, les investigations cliniques menées avec cet anticorps chez des patientes présentant un cancer de l'ovaire résistant à la chimiothérapie (4 patientes) ou chez des patients atteints d'un adénocarcinome pancréatique métastatique (7 patients) n'ont pas permis de mettre en évidence cette corrélation (Lamberts et al., 2016). Cette étude clinique a été menée, d'une part afin d'analyser la biodistribution de la molécule d'intérêt, et d'autre part afin de suivre la réponse au traitement avec le DMOT4039A. Au niveau du protocole expérimental, une imagerie TEP avec le ^{89}Zr -MMOT0530A a été réalisée 2, 4 et 7 jours après l'injection, puis l'imagerie a été renouvelée tous les 2 cycles de thérapie avec le DMOT4039A. Le ^{89}Zr -MMOT0530A s'accumule principalement dans le foie, les reins, la rate et les intestins de 2 à 7 jours post-injection (figure 71).

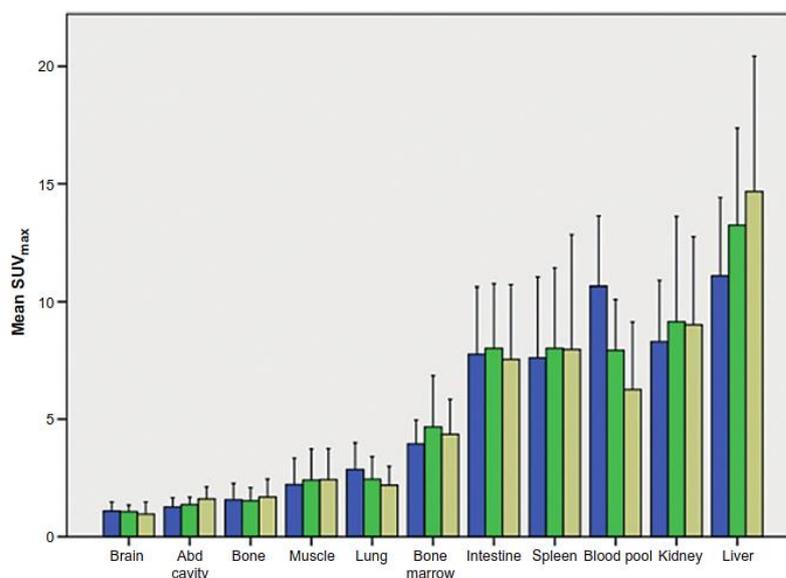


Figure 71. Biodistribution de ^{89}Zr -MMOT0530A chez les patients sur la base des imageries TEP à 2 (bleu), 4 (vert) et 7 (jaune) jours post-injection (Lamberts et al., 2016).

Le délai optimal après l'injection du traceur pour visualiser les lésions tumorales est de 4 jours avec des hétérogénéités notables dans la fixation. Les rapports de fixation lésions (tumeur primaire + métastases) / BF ou TBR à 2, 4 et 7 jours sont compris entre 0,9 et 2,7. Néanmoins, les lésions primaires chez les

individus avec un cancer du pancréas sont peu visibles avec des TBR de 1,28 à 7 jours post-injection. Les analyses *ex vivo* menées n'ont montré aucune corrélation entre le niveau d'expression de la MSLN établi en immunohistochimie et la fixation du traceur. Ceci peut être expliqué, d'une part par l'hétérogénéité au sein d'une lésion, mais également par le fait que les études immunohistochimiques ont été réalisées sur des archives de biopsies tumorales et le phénotype de celles-ci a pu évoluer entre le jour de la biopsie et celui de l'imagerie.

En parallèle de sa capacité à faire l'imagerie phénotypique de la MSLN, le ^{89}Zr -MMOT0530A a également été évalué pour son potentiel comme marqueur de la réponse au traitement par le DMOT4039A. Malheureusement, aucune corrélation entre la fixation tumorale de ^{89}Zr -MMOT0530A et la réponse anti-tumorale évaluée par scanner à rayons X n'a pu être établie. Si le ^{89}Zr -MMOT0530A a permis le ciblage des tumeurs du pancréas et de l'ovaire avec des imageries à 4 jours post-injection, il n'existe cependant aucune corrélation entre l'expression de la cible et la fixation du traceur analysée en imagerie TEP.

Les différents traceurs ciblant la MSLN sont rappelés dans le tableau 6. Tous les agents développés jusqu'à présent pour l'imagerie TEMP ou l'imagerie TEP sont des anticorps entiers et donc des molécules de haut poids moléculaire (150 kDa). Tous les traceurs ont permis une visualisation des tumeurs exprimant la cible *in vivo* dans des modèles pré-cliniques et cliniques. Cependant, la clairance sanguine et la fixation hépatique des anticorps entiers ne permettent pas (1) de réaliser des imageries à temps court et (2) d'obtenir des TBR élevés et donc de visualiser les lésions au sein du tissu hépatique, site préférentiel du cancer du sein métastatique. En conséquence, bien que de tels agents d'imagerie s'avèrent être des outils de recherche pertinents, ils ne semblent pas adaptés à la routine clinique.

Auteur	Etudes	Radio-élément	Molécule	Tumeur	Temps après image	Rapport de fixation tumeur/sang ou TBR	Autres Fixations
R.Hassan 1999	Pré-clinique	¹¹¹ In	mAbK1	Carcinome épidermoïde	24 à 168 h	1.4<T/S<3.74	Rein, Foie
Misri 2011	Pré-clinique	¹¹¹ In	mAbK1	Carcinome épidermoïde	24 à 72 h	1.2<T/S<5.3	Foie, Rate
Misri 2011	Pré-clinique	¹¹¹ In	mAbMB	Carcinome épidermoïde	48 à 72 h	2.42<T/S<4.02	Foie, Rate
Lindenberg 2015	Clinique	¹¹¹ In	mAb Amatuximab	Mésothéliome Pancréas	24 à 168 h	0.2<T/S<7.4 1.2<TBR<62	Rein, Foie, Rate
Kobayashi 2015	Pré-clinique	⁶⁴ Cu	mAb11-25	Pancréas	24 h et 48 h	0.6<T/S<1	Foie
Lee 2015	Pré-clinique	⁶⁴ Cu	mAb Amatuximab	Carcinome épidermoïde	3 à 48 h	0.3<T/S<6.4	Rein, Foie, Rate
J. Ter Weele 2015	Pré-clinique	⁸⁹ Zr	mAb (MMOT0530A)	Pancréas	144 h	T/S=3	Foie, Os
Terwisscha Van Scheltinga 2017	Pré-clinique	⁸⁹ Zr	mAb (MMOT0530A)	Pancréas Ovaire Mésothéliome	0 à 144 h	0.1<T/S<2	Non disponible
E. Lamberts 2016	Clinique	⁸⁹ Zr	mAb (MMOT0530A)	Pancréas (n=7) Ovaire (n=4)	48 à 168 h	0.7<TBR<2.6	Foie, Rein, Intestin

Tableau 6. Bilan des différents agents d'imagerie ciblant la MSLN.

Partie expérimentale

Partie expérimentale

Objectif du travail expérimental

La première partie de ce travail de thèse a porté sur **l'imagerie phénotypique des tumeurs du sein exprimant la MSLN**. Compte tenu du rôle majeur de la mésothéline dans la progression tumorale et la dissémination métastatique, et du fait que de nombreuses thérapies la ciblant soient actuellement en cours de transfert clinique, **il serait d'un grand intérêt de disposer d'un agent d'imagerie mesurant son expression**. Un tel outil permettrait de sélectionner les patientes susceptibles de bénéficier de ces thérapies, mais également de suivre l'efficacité de celles-ci. Dans le cadre d'une utilisation dans la maladie métastatique, l'agent d'imagerie idéal ne doit pas s'accumuler dans le foie et doit être rapidement éliminé de la circulation sanguine. Nous nous sommes donc orientés vers des fragments d'anticorps, de type nanobodies, avec une élimination sanguine rapide et exclusivement rénale. De tels agents ont déjà été validés pour le diagnostic et la thérapie de tumeurs, et notamment dans le cancer du sein (Nanobodies ciblant HER2, voir partie 6.2, page 80). Deux nanobodies anti-MSLN, dénommés A1 et C6, ont été produits par le centre de recherche en cancérologie (CRCM) de Marseille, Unité INSERM-CNRS 1068. Ces 2 nanobodies ont été caractérisés *in vitro* pour leur capacité à reconnaître spécifiquement la MSLN. Ils possèdent respectivement des affinités de 15 et 30 nM (Prantner et al., 2015).

Dans le contexte du développement de marqueurs compagnons en imagerie nucléaire pour les cancers du sein métastatiques, mon travail de thèse a consisté en la validation pré-clinique de ces agents. Pour cela, nous avons réalisé :

- i. L'évaluation *in vitro* de ces nanobodies, A1 et C6 après radiomarquage au Technétium-99m (^{99m}Tc), sur des lignées humaines de cancer du sein triple négatif.
- ii. L'évaluation *in vivo* de ^{99m}Tc -A1 et ^{99m}Tc -C6 sur des modèles murins porteurs de tumeurs humaines triple négatives.

Matériel et Méthodes

1. Etudes *in vitro*

1.1 Culture cellulaire

Deux lignées cellulaires humaines de cancer du sein triple négatif ont été utilisées dans cette étude. Ces deux lignées sont les **MDA-MB-231** et les **HCC70**. Elles ont été sélectionnées en fonction de leur phénotype (ER-, PR-, HER2-), l'expression de la mésothéline, mais aussi pour leur capacité à former des tumeurs lors de xénogreffes chez des souris immunodéficientes.

➤ MDA-MB-231

La lignée MDA-MB-231 est une lignée tumorale humaine établie à partir d'effusions pleurales d'une patiente de 51 ans de type caucasien présentant un adénocarcinome triple négatif du sein métastatique (Réf ATCC : HTB-26). Ces cellules sont adhérentes et de morphologie épithéliale (figure 72). Elles se développent en monocouches. Cette lignée de cellules est hautement métastatique lorsqu'elle est greffée au niveau de la glande mammaire chez des souris immunodéficientes (Iorns et al., 2012).

Les cellules MDA-MB-231 ont été cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) contenant de la L-glutamine (2 mM), du sodium pyruvate (1 mM) et du NaHCO₃ (1,5 g/L) (PAN BIOTECH). Ce milieu a été supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal (SVF South America, Lot S1163651810, Dutscher) et avec 1 % de Pénicilline-Streptomycine. Le temps de doublement indiqué par le fournisseur (ATCC®) pour cette lignée est d'environ 38 h. L'expression de la MSLN par ces cellules est sujette à controverse. Des études ont montré que les cellules MDA-MB-231 expriment faiblement la MSLN tandis que d'autres ont montré qu'elles ne l'expriment pas (Alewine et al., 2014 ; Uehara, Matsuoka, and Tsubura, 2008).

ATCC Number: **HTB-26**™
Designation: **MDA-MB-231**

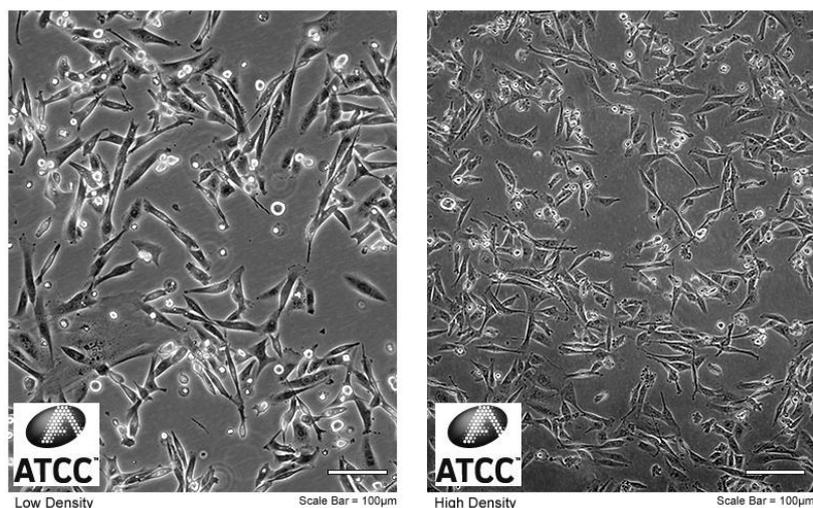


Figure 72. Clichés de cellules MDA-MB-231 observées par microscopie optique en contraste de phase (ATCC).

➤ [HCC70](#)

La lignée HCC70 est une lignée humaine établie à partir d'une patiente de 49 ans de type Africain présentant un cancer du sein canalaire invasif (Réf ATCC : CRL-2315). Elle est issue d'une tumeur de stade III, ce qui signifie que la tumeur a commencé à envahir les tissus environnants et notamment les ganglions régionaux : cette lignée est donc issue d'un carcinome métastatique. Les cellules HCC70 sont également épithéliales et se développent en monocouches (figure 73).

Les cellules HCC70 ont été cultivées dans du milieu RPMI-1640 contenant de la L-glutamine (2 mM), du sodium pyruvate (1 mM), de l'HEPES (10 mM), du NaHCO₃ (1,5 g/L) (PAN BIOTECH No : P04-18047). Ce milieu a été supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal et 1 % de Pénicilline-Streptomycine. Le temps de doublement indiqué est d'approximativement 73 heures. Ces cellules sont connues pour fortement exprimer la MSLN (Alewine et al., 2014).

ATCC Number: **CRL-2315**™
Designation: **HCC70**

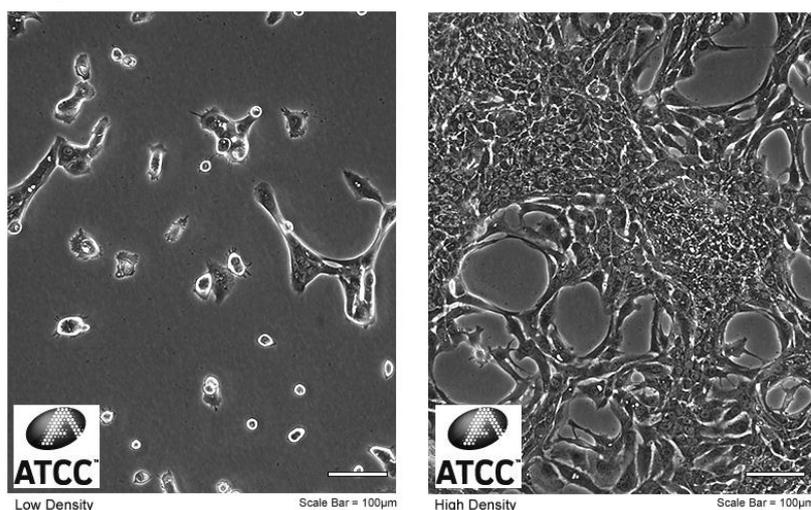


Figure 73. Clichés de cellules HCC70 observées par microscopie optique en contraste de phase (ATCC).

Les cellules HCC70 et MDA-MB-231 ont immédiatement été mises en culture à leur réception.

- **La décongélation**

La décongélation s'est effectuée par un chauffage au bain marie à 37 °C pendant 2 min. Les cellules ont été resuspendues dans leurs milieux respectifs complets préchauffés, puis transférées dans un tube de centrifugation (15 mL). Elles ont alors été sédimentées par centrifugation à 200 g pendant 5 min. Elles ont ensuite été reprises dans 5 mL de milieu complet, puisensemencées dans une boîte de culture (T-25). Le lendemain, le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais afin d'éliminer les déchets cellulaires.

- **La congélation**

Des lots de réserve ont été établis et conservés dans l'azote liquide à -196 °C. La congélation s'est effectuée à raison de 2,5 à 3 millions de cellules dans des cryotubes (1 mL), en présence d'un cryoprotecteur, le Diméthylsulfoxyde (DMSO) à 10 %, de SVF (15 %), dans du milieu de culture complet spécifique à chaque lignée. Le volume final est de 1 mL par cryotube. La congélation des cellules s'est faite de façon progressive et en plaçant les cryotubes dans une boîte contenant du

propane-2-ol à -80 °C (Mr Frosty, Cryo 1 °C Freezing container, Nalgen™). Ceci permet une diminution progressive de la température de 1 °C par minute. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules ont été transférées dans de l'azote liquide et stockées jusqu'à la prochaine décongélation.

- **Entretien des cellules**

Dès que les cellules sont arrivées à confluence, le milieu de culture a été aspiré, les cellules rincées avec du PBS sans Ca²⁺ et sans Mg²⁺, puis recouvertes avec une solution de trypsine 0,05 %, EDTA 0,02 % contenue dans du PBS sans Ca²⁺ et sans Mg²⁺. Elles ont alors été placées 5 minutes dans un incubateur à 37 °C sous atmosphère humide contenant 5 % CO₂. L'action de la trypsine a été stoppée par l'ajout de milieu complet (5 fois le volume de trypsine). Les cellules ont alors été reprises dans un tube de centrifugation et sédimentées par centrifugation à 200 g pendant 5 minutes. Elles ont alors été diluées et réparties dans de nouvelles boîtes, et enfin placées dans un incubateur à 37 °C sous atmosphère humide contenant 5 % CO₂. A noter que les cellules HCC70 ont nécessité un renouvellement complet de milieu tous les 2 jours.

- **Evaluation de la viabilité cellulaire**

La viabilité cellulaire des lignées MDA-MB-231 et HCC70 a été régulièrement mesurée par la mesure de l'incorporation du bleu trypan qui colore les cellules mortes. La viabilité peut ainsi être estimée de la manière suivante :

$$\% \text{ de viabilité} = \left(1 - \frac{\text{nombre de cellules bleues}}{\text{nombre de cellules totales}}\right) \times 100$$

La mesure de la viabilité cellulaire permet de contrôler l'état général des cellules. Une viabilité cellulaire supérieure à 95 % est considérée comme étant satisfaisante.

- **Détermination du temps de doublement cellulaire**

Outre la viabilité cellulaire, le temps de doublement (ou temps de génération, TG) renseigne également de l'état général des cellules. Il se définit

comme l'intervalle de temps nécessaire pour que la quantité de cellules double pendant la phase de croissance logarithmique.

Il a été calculé de la façon suivante :

$$TG = \frac{\log 2 \times T}{\log Y - \log X}$$

T est l'intervalle de temps (en heures ou en jours) écoulé entre le jour d'ensemencement des cellules (J 0) et le jour du comptage. Y représente le nombre de cellules au jour de comptage et X le nombre de cellules à J 0.

1.2 Détermination de l'expression de la MSLN en Western Blot

Les cellules MDA-MB-231 ou HCC70 (250 000) ont été ensemencées dans des puits de plaque 6-puits à J 0. Dès que les cellules ont atteint 85 à 90 % de confluence (J 2), elles ont été rincées avec une solution de PBS froid, et congelées à sec à -80°C pendant 2 h minimum. Elles ont ensuite été lysées à l'aide d'un grattoir, sur de la glace, après l'ajout de 150 μL de tampon RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0,1 %, sodium déoxycholate 0,5 %, Sodium orthovanadate 1 mM et cocktail d'inhibiteur de protéase (1/100, Protease Inhibitor Cocktail P8340, SIGMA)).

Le lysat cellulaire a alors été centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant contenant les protéines a été récupéré. La quantité de protéines a été déterminée par un dosage BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo-Fisher). Quarante microgrammes de protéines ont été dénaturés dans du Tampon Laemmli sodium dodecyl sulfate contenant du β -mercaptoéthanol (Sample Buffer, Laemmli 2 x concentrate, SIGMA).

Les lysats protéiques ont été déposés sur un gel d'acrylamide (4/15 % Mini PROTEAN® Bio-Rad). En parallèle des échantillons, un marqueur de taille a été déposé (5 μL Prism Ultra Protein Ladder 10-180 kDa, ab116027, Abcam). Les protéines ont été séparées par une électrophorèse réalisée à 130 V pendant 60 min (Mini PROTEAN® Tetra System, Bio-Rad). Une fois séparées, les protéines ont

alors été transférées (Trans-Blot® Turbo™ Transfert system, Bio-Rad) sur une membrane de nitrocellulose (0,45 µm, Bio-Rad).

La membrane de nitrocellulose a été saturée pendant 1 h à température ambiante avec du TBS-Tween 0,1 % - BSA 1 % sous agitation. La membrane a ensuite été incubée avec un anticorps anti-MSLN (1/2000 Polyclonal Anti-Mesothelin Picoband™ Antibody, Boster Immunoleader) contenu dans du TBS-Tween 0,1 % BSA 1 % sur la nuit à 4 °C sous agitation. La membrane a ensuite été lavée 3 fois pendant 5 min avec du TBS-Tween 0,1 %, puis incubée avec un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase de raifort (HRP) (1/2000, P0448, Dako), dilué dans la solution de blocage, pendant 1 h à température ambiante. La membrane a enfin été lavée 3 fois pendant 5 min avec une solution de TBS-Tween 0,1 %. La révélation de l'expression de la MSLN a été réalisée à l'aide de l'appareil Chemidoc™ MP system (Bio-Rad).

Afin de révéler l'expression de l'actine, les membranes ont été lavées avec un stripping buffer (SDS 0,1 %, glycine 1,5 %, Tween 1 %, pH 2,2) pendant 10 min sous agitation à température ambiante. La membrane a ensuite été lavée avec du PBS pendant 5 min, du TBS pendant 5 min, et incubée avec un anticorps de souris anti-actine humaine (1/5000, BD 612656) pendant 1 heure à température ambiante. La révélation a été réalisée comme précédemment décrite.

1.3 Mesure de la fixation des nanobodies A1 et C6 sur cellules par cytométrie en flux

La fixation des nanobodies A1 et C6 sur les cellules HCC70 et MDA-MB-231 a été mesurée par cytométrie en flux. Cette expérience a été réalisée à l'Institute for Advanced Biosciences (IAB, Grenoble) avec un appareil de type FACS Accuri C6 BD. Les cellules HCC70 et MDA-MB-231 cultivées dans leur milieu respectif, ont été rincées avec du PBS sans Ca²⁺ et sans Mg²⁺. Elles ont ensuite été décollées avec une solution d'EDTA (5 mM) contenue dans du PBS sans Ca²⁺ et sans Mg²⁺. Chaque lignée cellulaire a été répartie en 2 tubes à raison de 250 000 cellules par tube. Après 5 min de centrifugation à 200 g et à 4 °C, les cellules ont été resuspendues dans du PBS-BSA 2 % (étape de saturation) durant 30 min sur la glace. Après centrifugation et élimination du surnageant, les cellules ont été

incubées avec les nanobodies A1 (20 µg/mL), C6 (20 µg/mL) ou le nanobody contrôle cAbBcII10a (20 µg/mL, servant de contrôle isotypique) dans du PBS-BSA 2 % pendant 30 min sur la glace. Les cellules ont ensuite été lavées avec 2 mL de PBS froid puis centrifugées à 200 g durant 5 min, à 4 °C. Le surnageant a alors été éliminé et les cellules ont été incubées avec un anticorps anti-histidine de lapin (1/200, anti-6x His tag® antibody, ab9108 Abcam) pendant 30 min sur la glace. Après un lavage, les cellules ont été incubées avec un anticorps anti-IgG de lapin fluorescent (1/500, goat anti-Rabbit IgG H&L, AlexaFluor® 488, ab150077 Abcam). Enfin, après un dernier lavage au PBS, les cellules ont été resuspendues dans 250 µL de PBS et les échantillons analysés au cytomètre de flux.

Lors de l'acquisition, les cellules ont été sélectionnées en fonction de leur taille et de leur granulométrie. La fluorescence nulle (ou zéro) est définie par celle du contrôle isotypique. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à l'expression de l'antigène, ici la MSLN, présent à la surface des cellules.

1.4 Radiomarquage des nanobodies A1 et C6 au ^{99m}Tc et stabilité

➤ Méthode de radiomarquage

Les nanobodies A1, C6 et contrôle ont été radiomarqués au ^{99m}Tc (^{99m}Tc-A1, ^{99m}Tc-C6 et ^{99m}Tc-Ctle) sur leur site spécifique « tag polyhistidine » (queue de 6 résidus histidine en C-terminal) via la méthode tricarbonyle précédemment décrite (Broisat et al., 2012). La méthodologie de marquage comporte une première étape qui consiste à former le précurseur ($[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}-(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO}_3)]^+$) via le kit commercial tricarbonyle (PSI, Suisse). Au cours de la seconde étape, le précurseur ainsi formé échange rapidement ses molécules d'eau pour se complexer au "tag histidine" (ligands donneurs d'électrons). Brièvement, 1 mL de [^{99m}Tc]-pertechnétate (2,5–3 GBq) a été incubé avec le kit pendant 20 min à 100 °C pour former le précurseur ^{99m}Tc-tricarbonyle. Après neutralisation (pH 6,5-7), 500 µL du précurseur ont été ajoutés à 50 µg d'une solution de nanobody A1, C6 ou contrôle. La solution a été incubée pendant 60 min à 60 °C et ensuite purifiée sur une colonne Sephadex G25 (NAP-5, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) avec du PBS, avant d'être passée sur un filtre 0,22 µm Millex (Millipore, Bedford, MA, USA).

➤ Stabilité dans le milieu de marquage

La pureté radiochimique (PRC) de $^{99m}\text{Tc-A1}$ et de $^{99m}\text{Tc-C6}$ a été immédiatement déterminée après radiomarquage par radio-HPLC (Shimadzu) en utilisant une colonne C4 (Symmetry 300 C4, 3,5 μm , 4,6 mm x 150 mm) avec un gradient de phase mobile de 0-5 min : 5 % solvant B, 5-20 min : 5 %-60 % solvant B ; 20-25 min : 60 % solvant B ; 25-30 min : 60%-5% solvant B avec un débit à 1 mL/min. Les deux solvants utilisés sont : le solvant A : 0,1 % acide trifluoroacétique (TFA) dans de l'eau et le solvant B avec 0,1 % TFA, 90 % acétonitrile (ACN). La radioactivité a été évaluée en utilisant un radiodétecteur (γ -RAM Model 4, LabLogic). La PRC des nanobodies a également été réalisée 6 h après radiomarquage.

➤ Stabilité *in vitro* dans le sang humain et répartition sanguine

La stabilité *in vitro* des deux ^{99m}Tc -nanobodies a été évaluée dans du sang humain. Soixante-quatorze MBq de $^{99m}\text{Tc-A1}$ ou $^{99m}\text{Tc-C6}$ ont été incubés avec 1 mL de sang humain à 37 °C. A 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h et 6 h d'incubation, des échantillons de sang (120-150 μL) ont été prélevés et centrifugés (4000 g, 2 min) afin de séparer le plasma des globules rouges. La radioactivité du plasma et des globules rouges a été mesurée respectivement dans le surnageant et dans le culot à l'aide d'un activimètre (Capintec CRC-15R). Afin de séparer les protéines plasmatiques (\gg 15 kDa) du reste du plasma, 5 μL d'acide trichloroacétique (TCA) 10 % ont été ajoutés à la fraction plasmatique, et cette fraction a alors été centrifugée à 11 000 g pendant 3 min. Les protéines plasmatiques (\gg 15 kDa) sont retrouvées dans le culot. La répartition sanguine de $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$ dans les globules rouges, les protéines plasmatiques (\gg 15 kDa) et le plasma a ainsi pu être déterminée. Les résultats ont été exprimés en % de l'activité sanguine totale.

➤ Stabilité *in vivo* dans le sang de souris

La stabilité des nanobodies $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$ *in vivo* a également été évaluée. Deux heures après l'injection du radiotracer, les souris BALB/c Nude ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane 2 % et une ponction intracardiaque a été réalisée afin de prélever le sang dans une cavité ventriculaire. Le sang a immédiatement été centrifugé (4 000 g, 2 min) dans le but de séparer les globules

rouges et le plasma. Les protéines plasmatiques (>> 15 kDa) ont été précipitées en utilisant du TCA 10 % et en centrifugeant à 11 000 g pendant 3 min. La fraction plasmatique sans grosses protéines a été analysée en radio-HPLC comme décrit précédemment.

1.5 Détermination de l'affinité de ^{99m}Tc-A1 et ^{99m}Tc-C6

➤ Détermination de l'affinité sur protéine recombinante

L'affinité des nanobodies A1 et C6 après radiomarquage (^{99m}Tc-A1 et ^{99m}Tc-C6) a été déterminée par la méthode ELISA. Cent nanogrammes (100 ng) de MSLN recombinante humaine (R&D Systems) contenue dans 100 µL de PBS ont été immobilisés dans des puits de plaques ELISA sécables (Corning Costar Stripwell, SIGMA) à 4 °C sur la nuit. Après une étape de saturation avec du PBS-lait 1 %, différentes dilutions de ^{99m}Tc-A1 et ^{99m}Tc-C6, de 1 µM à 0,8 nM ont été incubées pendant 1 h à température ambiante. L'activité non liée a été éliminée en lavant 5 fois avec une solution de PBS-Tween 0,1 %. La radioactivité présente dans chacun des puits a été comptée au compteur gamma (Wizard², Perkin Elmer). L'activité non spécifique a été déterminée après l'incubation de ^{99m}Tc-A1 et ^{99m}Tc-C6 dans des puits vides. Le Kd a été calculé en corrigeant la fixation totale de la fixation non spécifique pour chaque concentration de ^{99m}Tc-A1 ou ^{99m}Tc-C6 et en ajustant les données par une régression non linéaire ($y=B_{max} * x / (Kd+x)$) à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6 (GraphPad Software).

➤ Détermination de l'affinité sur cellules

L'affinité de ces deux nanobodies radiomarqués a également été déterminée sur des lignées cellulaires. A J 0, 15 000 cellules HCC70 et 11 000 cellules MDA-MB-231 ont étéensemencées dans une plaque 96 puits. A J 1, le milieu des cellules a été renouvelé. A J 2, le milieu a été aspiré, les cellules ont été lavées au PBS et fixées à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 2 % pendant 5 min à température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées 2 fois au PBS, puis les étapes de saturation et d'incubation des nanobodies ont été réalisées comme précédemment décrites. Le Kd a également été déterminé comme décrit dans le paragraphe ci-dessus.

1.6 Etude de compétition

Afin de s'assurer de la spécificité de liaison des nanobodies $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$, des études de compétition *in vitro* sur des cellules ont été menées. Les cellules HCC70 (250 000) et MDA-MB-231 (250 000), préalablement décollées avec une solution d'EDTA (Éthylènediaminetétraacétique) à 5 mM, et contenues dans du PBS, ont été placées dans un tube à hémolyse. Après une sédimentation par centrifugation, réalisée à 200 g et à 4 °C, et une saturation d'une heure avec du PBS-BSA 1 %, les cellules ont été incubées avec 45 nM de $^{99m}\text{Tc-A1}$ ou 130 nM de $^{99m}\text{Tc-C6}$, avec ou sans ajout d'un excès de 150 fois du même nanobody non radiomarqué, pendant 1 heure sur la glace. Les cellules ont ensuite été lavées 5 fois avec du PBS froid afin d'éliminer la fraction non liée aux cellules et la radioactivité présente dans chacun des tubes a été comptée au compteur gamma (Wizard², Perkin Elmer).

2. Etudes *in vivo* - Imagerie des tumeurs greffées en sous-cutanée exprimant la MSLN

2.1 Modèle animal

Toutes les procédures d'expérimentation animale ont été acceptées par le comité d'éthique de l'Université Grenoble Alpes (Cometh Grenoble, CEEA n°12) et autorisées par le ministère l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation (MESRI). Des souris femelles BALB/c nude (Janvier Lab) ont été utilisées pour les différentes expérimentations. Ces souris présentent une aplasie du thymus, et sont donc de ce fait déficientes en lymphocytes T (LT) matures. Cette absence de LT matures va faciliter le développement des tumeurs humaines xénogreffées sur la souris. Du fait de cette immunodéficiences, les souris ont été placées dans des cages avec un filtre, dans une armoire ventilée autonome, à 25 °C et 30 à 50 % d'hygrométrie. La nourriture et l'eau de boisson ont été stérilisées et fournies *ad libitum*. Les cages, les litières et l'eau ont été changées à raison de 2 fois par semaine. Lors de leur manipulation (suivi de poids, suivi de la croissance tumorale) les souris ont été placées sous une hotte à flux laminaire.

Les cellules cultivées dans leur milieu respectif ont été amplifiées. La veille de l'implantation tumorale, le milieu de culture cellulaire a été renouvelé pour optimiser l'état des cellules. Les souris âgées de 5 semaines ont été implantées au niveau de la patte arrière gauche par voie sous-cutanée avec 3,5 millions de cellules HCC70 (n=22) ou 2 millions de cellules MDA-MB-231 (n=10) dans un mélange PBS-Matrigel® haute concentration (Matrice Corning Matrigel®) 2:1, dans un volume final de 180 µL, à l'aide d'une seringue 26 G. L'implantation tumorale en Matrigel® nécessitant de travailler à 4 °C, ce dernier a été placé au réfrigérateur 12 h avant l'implantation afin qu'il devienne liquide, et le matériel nécessaire (seringues, cônes, tubes) a été placé au congélateur. L'implantation s'est déroulée sous anesthésie volatile, à l'aide d'un mélange Air-O₂-Isoflurane 2 %.

➤ Suivi de la croissance tumorale

Après l'implantation, les souris ont été quotidiennement observées. Elles ont également été pesées à raison de 3 fois par semaine. Dès l'apparition des tumeurs, le volume tumoral a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse à lecture digitale (précision 10^{-2} mm, Fischer Darex). La longueur, la largeur ainsi que la hauteur (ou épaisseur de la tumeur) ont été mesurées.

Afin d'obtenir le volume tumoral, la formule du volume d'un ellipsoïde a été appliquée :

$$\text{Volume} = (\text{Longueur} \times \text{Largeur} \times \text{Epaisseur}) \times \pi/6$$

A partir de ce volume tumoral, le temps de doublement tumoral a pu être déterminé. Ce temps de doublement (TD) est donné grâce à la formule suivante, avec V2 représentant le volume tumoral final, V1 le volume tumoral initial, t2 le temps de la mesure finale, et t1 le temps de la mesure initiale :

$$\text{TD} = \frac{\ln 2}{\left(\frac{\ln (V2/V1)}{t2-t1} \right)}$$

➤ Point limite de l'étude

Un volume tumoral de 1500 mm^3 a été défini comme point limite pour cette étude, conformément aux recommandations du comité d'éthique local. L'étude a été conduite sur des volumes tumoraux compris entre 200 et 600 mm^3 . Ce point limite n'a donc pas été atteint. Par ailleurs, tout signe de faiblesse, de prostration de l'animal ou encore une perte de poids $> 20 \%$ ont également été considérés comme des points limites à l'étude. Aucun animal n'a atteint un point limite lors de cette étude.

2.2 Injection du radiotracteur

Dès que la tumeur a atteint un volume compris entre 200 et 600 mm³, les animaux ont été placés 1-2 minutes près d'une lampe à infrarouge, source de chaleur, afin de dilater les veines latérales de la queue. Les souris ont alors été placées dans un tube à contention et injectées avec le radiotracteur ^{99m}Tc-A1, ^{99m}Tc-C6 ou ^{99m}Tc-Ctle, par voie veineuse. Les différents groupes constitués sont rappelés dans le tableau ci-dessous.

Tumeur implantée	Nombre de souris	Molécules injectées	Activités injectées (MBq)	Volume tumoral (mm ³) le jour de l'injection
HCC70	8	^{99m} Tc-A1	52,5 ± 9,6	481 ± 109
	7	^{99m} Tc-C6	59,4 ± 6,1	344 ± 75
	7	^{99m} Tc-Ctle	46,8 ± 11,2	485 ± 173
MDA-MB-231	6	^{99m} Tc-A1	68,5 ± 11,8	252 ± 33
	4	^{99m} Tc-Ctle	61,6 ± 8,5	212 ± 45

Tableau 7. Les différents groupes de souris injectées avec ^{99m}Tc-A1, ^{99m}Tc-C6 et ^{99m}Tc-Ctle.

2.3 Imagerie corps entier et quantification de la fixation tumorale

Une heure après l'injection du radiotracteur, les animaux ont été anesthésiés à l'isoflurane 2 % dans un mélange oxygène/air 1:1 et l'imagerie TEMP/TDM a été réalisée à l'aide de la caméra nano-SPECT-CT, caméra pré-clinique dédiée au petit animal (Bioscan/Mediso). Durant l'acquisition, la température des animaux a été régulée et leur fréquence respiratoire monitorée afin d'ajuster, si nécessaire, le degré d'anesthésie. Une imagerie tomodensitométrique (TDM, rayons X) a d'abord été réalisée avec les paramètres suivants : 45 kV, 240 projections, 500 ms par projection, puis une acquisition TEMP de 45 minutes du corps entier a été réalisée : 24 projections, 200 ms par projection. Dès la fin des acquisitions, les acquisitions TEMP et TDM ont été reconstruites afin d'obtenir des volumes tridimensionnels, puis elles ont été fusionnées à l'aide du logiciel Nucline (Nucline/Mediso). Les quantifications ont été effectuées à l'aide du logiciel Vivoquant (InVivo). Afin de

quantifier la fixation tumorale des traceurs, un volume d'intérêt (sphère de 50 mm³) a été défini en se basant sur les images anatomiques obtenues grâce à l'imagerie TDM. Un exemple du placement de ce volume est présenté ci-dessous (figure 74). Les résultats de la fixation tumorale du traceur ont été exprimés en % de la dose injectée rapporté au volume du tissu (% DI/cm³). Cette grandeur correspond à l'activité captée par centimètre cube de tissu, corrigée de la dose injectée (en MBq). On considère que 1 cm³ ≈ 1 g pour les différents organes étudiés.

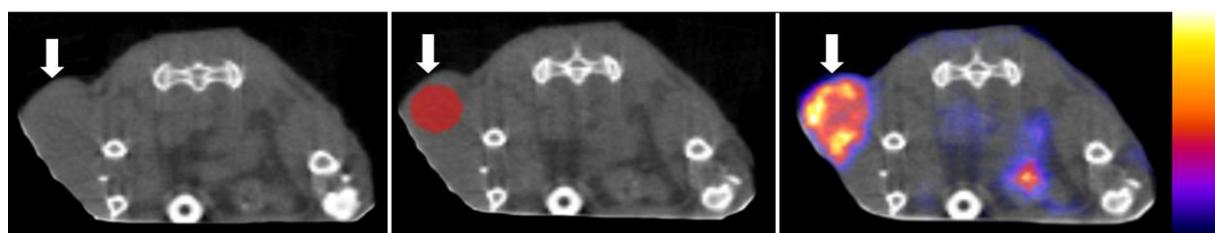


Figure 74. Exemple de positionnement du volume d'intérêt au sein de la tumeur sur des coupes transversales de TEMP/TDM. La tumeur est pointée par la flèche blanche. A gauche, une imagerie TDM, au centre l'imagerie TDM avec le positionnement de la région d'intérêt en rouge, et à droite l'imagerie TDM fusionnée à l'imagerie TEMP.

2.4 Etudes de biodistribution

Deux heures après l'injection du radiotracer, et directement après l'imagerie TEMP/TDM, une biodistribution par prélèvements d'organes a été réalisée. Les animaux, toujours anesthésiés, ont été euthanasiés par inhalation de CO₂, puis les organes ont été prélevés, pesés et placés dans des tubes de comptage. La radioactivité a été comptée au compteur gamma (Wizard², PerkinElmer). La fixation dans les différents organes a été corrigée du poids de l'organe, de la décroissance radioactive et de la dose injectée (MBq). Les résultats ont été exprimés en % DI/g de tissu.

3. Etudes *in vivo* – Etudes de compétition

3.1 Modèle animal

Tout comme lors de la première étude *in vivo*, des souris BALB/c Nude ont été utilisées. Dix (10) souris femelles ont été implantées avec les cellules HCC70 (voir partie imagerie des tumeurs greffées en sous-cutanée, pages 142-143) et la croissance tumorale a été suivie comme précédemment décrite.

3.2 Injection du radiotracteur

Dès que la tumeur a atteint un volume compris entre 200 et 500 mm³, les animaux ont été placés 1-2 minutes près d'une lampe à infrarouge. Les souris ont alors été injectées avec le radiotracteur ^{99m}Tc-A1 en présence ou non du nanobody A1 non marqué, à une concentration 150 fois plus importante que le ^{99m}Tc-A1. Les différents groupes constitués sont rappelés dans le tableau ci-dessous.

Tumeur implantée	Nombre de souris	Molécules injectées	Activités injectées (MBq)	Volume tumoral (mm ³) le jour de l'injection
HCC70	5	^{99m} Tc-A1	29,2 ± 6,5	390 ± 81
	5	^{99m} Tc-A1 + A1 (x150)	26,1 ± 4,3	348 ± 43

Tableau 8. Les différents groupes constitués pour l'étude de compétition *in vivo*.

3.3 Imagerie et biodistribution

La biodistribution de ^{99m}Tc-A1 a été déterminée par imagerie TEMP/TDM et par prélèvements d'organes puis comptage de la radioactivité comme décrit précédemment.

4. Etudes *ex vivo*

4.1 Analyse de l'expression de la MSLN

➤ Western Blot

A l'issue de la biodistribution, une partie de la tumeur a rapidement été placée dans un tube eppendorf 1,5 mL et congelée dans l'azote liquide. Cinq mg de tumeur ont été broyés à l'aide d'un Potter en présence de 100 µL de Tampon RIPA sur la glace. Le lysat a été centrifugé à 10 000 g pendant 10 min à 4 °C, et le surnageant a été récupéré et dosé comme précédemment décrit. Quarante (40) µg de protéines ont été déposés sur un gel d'acrylamide 4/15 %, et la suite de l'expérimentation a été réalisée comme précédemment décrite. Pour le contrôle de charge, la membrane a été incubée avec un anticorps anti-actine de souris comme décrit précédemment ou avec un anticorps anti-cofiline de lapin (1/2000, ab124979 Abcam®). L'expression relative de la MSLN a été quantifiée par une mesure de densitométrie du signal, en utilisant le logiciel ImageJ.

➤ Immunohistochimie

A l'issue de la biodistribution, une partie de la tumeur a également été incluse dans du Tissue-Tek (Microm, France), puis immédiatement congelée par une immersion dans un béccher contenant de l'isopentane, placé à -40 °C. Des coupes de tumeurs de 10 µm d'épaisseur ont été réalisées avec un cryo-microtome (HM 505^E, Microm, France), puis déposées sur des lames en verre, et les coupes ont été congelées à -40 °C.

- Anticorps commercial

Le jour de l'expérimentation, les tissus ont été fixés dans un bain d'acétone pendant 10 min. Les peroxydases endogènes ont été bloquées par un bain d'eau oxygénée à 0,15 % contenu dans de l'eau distillée pendant 15 min. Les coupes de tissus ont été encerclées par un film hydrophobe (Dako Pen). Les sites non spécifiques ont été saturés pendant une heure avec une solution de blocage : PBS-0,5 % gélatine de peau de poisson (Skin Fish Gelatin, SFG, Sigma).

Les lames ont ensuite été incubées avec un anticorps anti-MSLN (1/1000, Polyclonal Anti-Mesothelin Picoband™ Antibody, Boster Immunoleader) dilué dans un tampon PBS-SFG 0,5 % - sérum de chèvre 10 % sur la nuit à 4 °C sous atmosphère humide. Après 3 bains de 5 min dans du PBS-SFG 0,5 %, les lames ont été incubées avec un anticorps biotinylé anti-IgG de lapin, produit chez la chèvre (1/500, BA-1000, Vector®) pendant 1 h à température ambiante. Après 3 lavages, la solution ABC (Vectastain PK-6100, Vector®) a été appliquée pendant 30 min à température ambiante sur les tissus. Cette solution contient les peroxydases biotinylées et des molécules d'avidine sur lesquelles vont pouvoir se complexer à la fois l'anticorps secondaire et les peroxydases biotinylées. Après 4 lavages de 5 min au PBS, la solution de DAB (3,3'-diaminobenzidine) a été déposée sur les lames pendant 2 min. Après rinçage à l'eau distillée, une contre coloration à l'hématoxyline a été réalisée en plongeant les lames 2 min dans cette solution. Les lames ont ensuite été déshydratées par passages successifs dans 3 bains d'éthanol à 100 % de 30 secondes, suivis de 2 bains de xylène 100 %. Les lames ont ensuite été montées et conservées jusqu'à leur analyse au microscope.

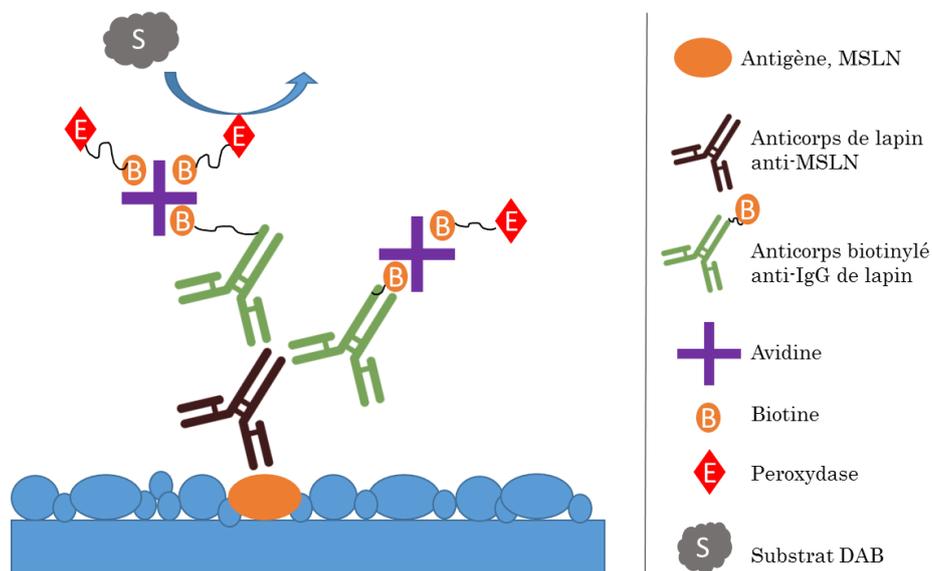


Figure 75. Représentation schématique du protocole d'immunohistochimie anti-MSLN réalisé avec un anticorps commercial.

- Nanobody A1

Des études d'IHC ont également été menées en utilisant le nanobody A1 comme anticorps primaire. Le principe diffère quelque peu de celui utilisé avec l'anticorps classique précédemment détaillé. Les sites non spécifiques ont été bloqués à l'aide d'une solution PBS-BSA 2 % pendant 1 h à température ambiante. Les lames ont ensuite été incubées avec 20 µg/mL du nanobody A1 ou contrôle contenu dans du PBS-BSA 2 % sur la nuit à 4 °C. Après les lavages réalisés au PBS-BSA 2%-Tween 0,05 %, les coupes ont été incubées avec un anticorps anti-histidine de lapin (1/500, anti-6x His tag® antibody, ab9108 Abcam) pendant 1 h, puis avec un anticorps biotinylé anti-IgG de lapin produit chez la chèvre (1/500, BA-1000, Vector®). La révélation a été réalisée comme précédemment décrite avec l'anticorps classique.

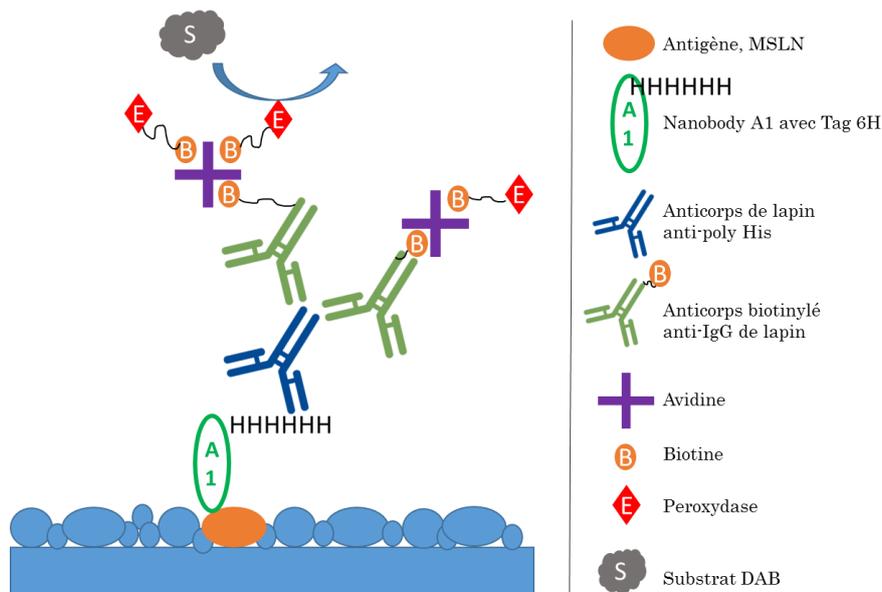


Figure 76. Représentation schématique du protocole d'immunohistochimie anti-MSLN réalisé avec le nanobody A1.

5. Analyse statistique

Les données ont été exprimées sous forme de moyenne \pm écart-type. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Un test de Mann-Whitney a été utilisé pour les comparaisons inter-groupe. Un test de régression linéaire de Pearson a également été utilisé pour déterminer le coefficient de corrélation liant la fixation tumorale obtenue en biodistribution avec celles obtenue par imagerie TEMP. Le seuil de significativité a été fixé à 5 % ($p < 0,05$).

Résultats

1. Etudes *in vitro*

1.1 Viabilité cellulaire et mesure du temps de doublement

La viabilité cellulaire des deux lignées cellulaires MDA-MB-231 et HCC70 a été évaluée à chaque passage. Pour les deux lignées, la viabilité cellulaire a toujours été supérieure à 95 %. Le temps de doublement des deux lignées cellulaires a régulièrement été évalué (tableau 9). Pour la lignée MDA-MB-231, le temps de doublement calculé correspond à celui renseigné par ATCC. Concernant la lignée HCC70, le temps de doublement calculé est plus court que celui renseigné sur le site ATCC (59 h contre 73 h). Cette différence pourrait provenir du fait que la population de cellules du laboratoire est différente de celle initialement évaluée par ATCC, ou alors provenir de la composition du milieu de culture.

Lignée cellulaire	MDA-MB-231	HCC70
Temps de doublement calculé	32 ± 4 heures	59 ± 7 heures
Temps de doublement théorique	38 heures	73 heures

Tableau 9. Temps de doublement des cellules MDA-MB-231 et HCC70 théoriques (ATCC®) et déterminés expérimentalement.

1.2 Mesure de l'expression de la MSLN en Western Blot

L'expression de la MSLN par les lignées HCC70 et MDA-MB-231 a été évaluée par Western Blot (figure 77). L'anticorps anti-MSLN détecte une seule et unique bande à 40 kDa, correspondant à la forme membranaire de la protéine MSLN. Cette bande est clairement identifiable pour la lignée HCC70, et absente pour la lignée MDA-MB-231. Les cellules HCC70 expriment donc la MSLN alors que les cellules MDA-MB-231 ne l'expriment pas.

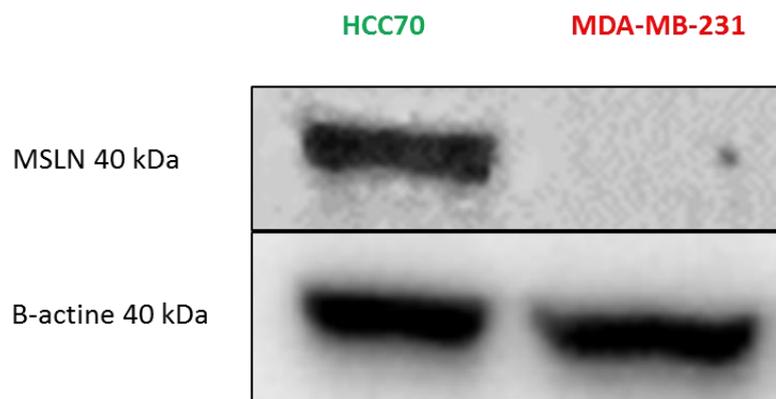


Figure 77. Mesure de l'expression de la MSLN des lignées HCC70 et MDA-MB-231 par Western Blot. Quarante microgrammes de lysat cellulaire (HCC70 et MDA-MB-231) ont été déposés sur un gel d'acrylamide et transférés sur une membrane de nitrocellulose. L'expression de la MSLN et de l'actine a ensuite été révélée par WB.

1.3 Mesure de la fixation du nanobody A1 en cytométrie de flux

La fixation des nanobodies A1 et C6 sur les cellules HCC70, exprimant la cible, et sur les cellules MDA-MB-231 ne l'exprimant pas, a été évaluée par cytométrie en flux (figure 78). Les nanobodies A1 et C6 se fixent sur les cellules HCC70 qui expriment la cible et ne se fixent pas sur les cellules MDA-MB-231 qui n'expriment pas la MSLN.

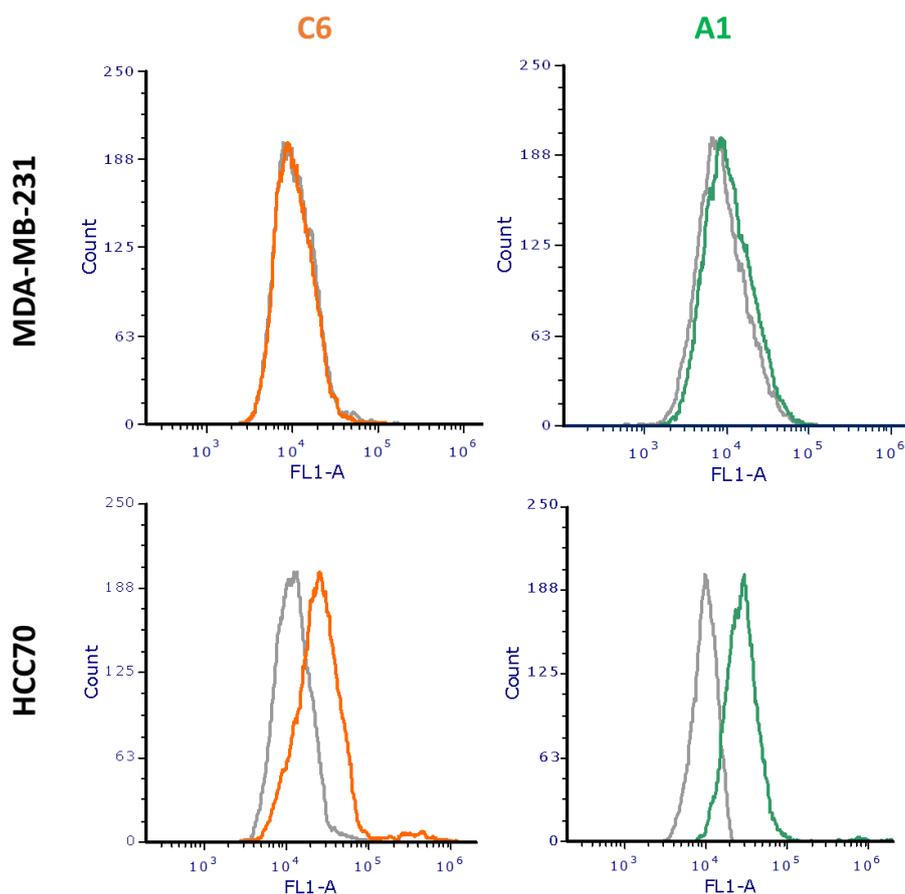


Figure 78. Mesure de la fixation des nanobodies A1 et C6 sur les cellules HCC70 et MDA-MB-231 par cytométrie en flux. Les cellules ont été décollées avec une solution de PBS-EDTA 5 mM et incubées avec le nanobody A1 (20 µg/mL), C6 (20 µg/mL) ou contrôle (20 µg/mL, en gris).

1.4 Radiomarquage au ^{99m}Tc et stabilité

Les nanobodies A1 et C6 ont ensuite été radiomarqués afin de réaliser des études *in vitro* puis *in vivo*. Le radiomarquage de ces 2 molécules via la méthode tricarbonyle a été réalisé avec succès. La pureté radiochimique (PRC) des produits radiomarqués (^{99m}Tc -A1 et ^{99m}Tc -C6) a été déterminée immédiatement, puis 6 heures après le radiomarquage par radio-HPLC (tableau 10). Après purification, la PRC a toujours été supérieure à 98 % : ^{99m}Tc -A1 et ^{99m}Tc -C6 sont stables jusqu'à 6 h après le radiomarquage.

	Pureté radiochimique (%)	
	Immédiatement après radiomarquage	6 h après radiomarquage
$^{99m}\text{Tc-A1}$	$99,7 \pm 0,1$	$99,2 \pm 0,1$
$^{99m}\text{Tc-C6}$	$99,1 \pm 0,8$	$98,8 \pm 0,5$

Tableau 10. Pureté radiochimique de $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$ immédiatement et 6 h après le radiomarquage.

1.5 Détermination de l'affinité de $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$

➤ Sur protéine recombinante

Après radiomarquage au ^{99m}Tc , l'affinité des nanobodies $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$ pour la MSLN recombinante humaine a été déterminée par ELISA. L'affinité de $^{99m}\text{Tc-A1}$ pour la MSLN recombinante est près de 3 fois supérieure à celle de $^{99m}\text{Tc-C6}$ ($43,9 \pm 4,0$ nM vs $107,3 \pm 15,9$ nM) (figure 79).

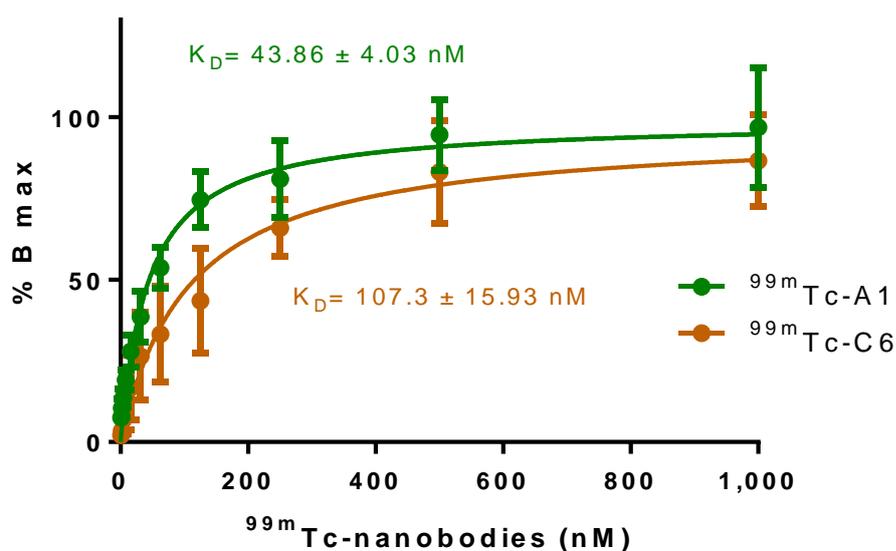


Figure 79. Détermination de l'affinité de $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$ sur MSLN recombinante par ELISA. La fixation spécifique de $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$ sur la MSLN est représentée ici.

➤ Sur cellules

L'affinité des nanobodies $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$ a également été déterminée sur les cellules HCC70. Les cellules MDA-MB-231 ont été utilisées pour déterminer la fixation non-spécifique des deux traceurs. Pour chaque concentration étudiée, la valeur de la fixation sur les cellules MDA-MB-231 a été retranchée à celle de la fixation sur les cellules HCC70 afin d'obtenir la valeur spécifique.

Les affinités des 2 nanobodies pour les cellules exprimant la MSLN sont sensiblement identiques à celles déterminées sur protéine recombinante. $^{99m}\text{Tc-A1}$ a une affinité 3 fois plus élevée que $^{99m}\text{Tc-C6}$ ($45,2 \pm 10,9$ nM vs $134,7 \pm 36,9$ nM) pour les cellules exprimant la MSLN (figure 80).

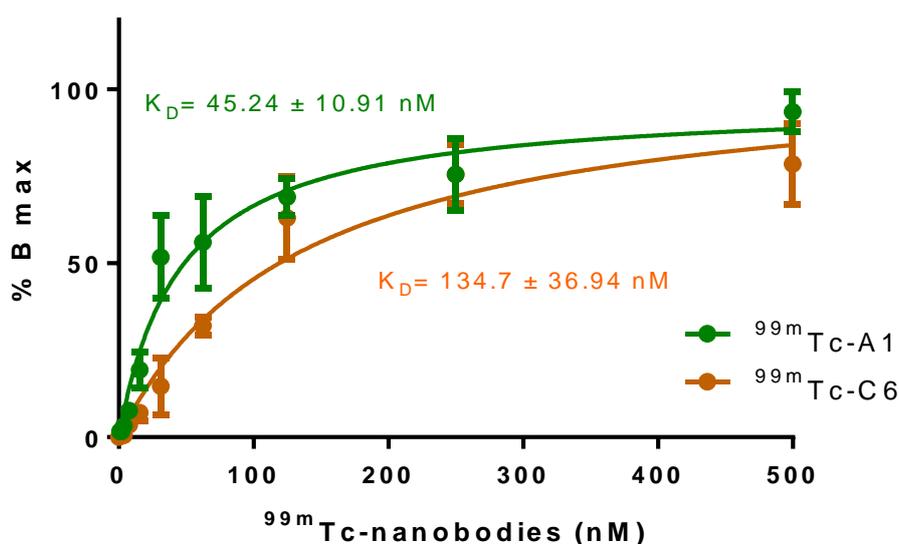


Figure 80. Détermination de l'affinité de $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$ sur les cellules HCC70 déterminée en ELISA. La fixation spécifique de $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$ sur des cellules exprimant la MSLN est représentée ici.

1.6 Compétition *in vitro* sur cellules

Afin d'évaluer la spécificité de la liaison des nanobodies $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$ aux cellules exprimant la MSLN, des études *in vitro* de compétition ont été réalisées (figure 81). L'incubation des cellules MDA-MB-231 et HCC70 avec 40 nM de $^{99m}\text{Tc-A1}$ a montré que $^{99m}\text{Tc-A1}$ se fixe près de 8 fois plus sur les HCC70 que

sur les cellules MDA-MB-231. L'ajout d'un excès de 200 fois de la molécule A1 non radiomarquée diminue la fixation de $^{99m}\text{Tc-A1}$ de 7 fois ($p < 0,001$).

L'incubation des cellules MDA-MB-231 et HCC70 avec 130 nM de $^{99m}\text{Tc-C6}$ a montré qu'il se fixe près de 5 fois plus sur les cellules HCC70 que sur les cellules MDA-MB-231. L'ajout d'un excès de la molécule C6 non radiomarquée diminue cette fixation, la restaurant au niveau de sa fixation sur les cellules MDA-MB-231 ($p < 0,001$).

Ces études de compétition ont donc permis de confirmer la spécificité de liaison de ces deux nanobodies sur les cellules exprimant la MSLN.

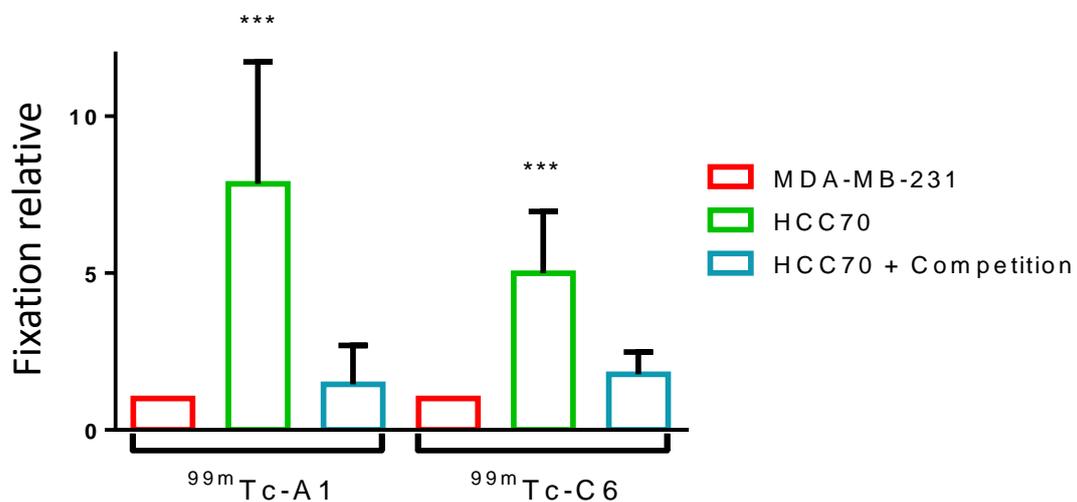


Figure 81. Mesure de la fixation de $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$ sur les cellules MDA-MB-231 et HCC70 en présence ou non d'un excès d'A1 ou de C6. Les cellules ont été incubées avec 40 nM de $^{99m}\text{Tc-A1}$ et 130 nM de $^{99m}\text{Tc-C6}$ en présence ou non d'un excès de 200 fois de la même molécule non radiomarquée. $P < 0,001$ vs HCC70 + Compétition.

Bilan des manipulations *in vitro*

Au cours de cette première partie concernant l'évaluation *in vitro* des nanobodies A1 et C6, nous avons montré que **les cellules HCC70 expriment la MSLN contrairement à la lignée MDA-MB-231**. Les données obtenues en cytométrie en flux ont permis de montrer que les nanobodies A1 et C6 se fixent spécifiquement sur les cellules HCC70 exprimant la mésothéline. Le radiomarquage des nanobodies A1 et C6 via la méthode tricarbonyle a été réalisé avec succès et les deux produits générés **$^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$ sont stables jusqu'à 6 h après le radiomarquage**, validant leur utilisation pour les expérimentations *in vitro*. Nous avons pu montrer que les nanobodies **$^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$ présentent de fortes affinités, de l'ordre du nanomolaire, pour la MSLN humaine recombinante, mais également pour la MSLN cellulaire humaine**. Nous avons pu observer dans les 2 cas que l'affinité de $^{99m}\text{Tc-A1}$ était près de 3 fois supérieure à celle de $^{99m}\text{Tc-C6}$, confirmant les études menées par Prantner et al. avec ces deux nanobodies non radiomarqués. Les études de compétition *in vitro* ont permis de démontrer **la spécificité de liaison des nanobodies $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$** . Ils se fixent respectivement environ 8 et 5 fois plus sur les cellules HCC70 exprimant la mésothéline que sur les cellules MDA-MB-231 n'exprimant pas cette protéine. L'ajout d'un excès du même nanobody, non radiomarqué, a permis de diminuer significativement la fixation de $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$ sur les cellules HCC70, démontrant la spécificité de liaison de ces deux nanobodies sur les cellules exprimant la mésothéline.

2. Evaluation du potentiel de $^{99m}\text{Tc-A1}$ et ^{99m}Tc pour l'imagerie *in vivo*

1.1 Etudes de stabilité de $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$

➤ Stabilité *in vivo* chez la souris

Les profils de $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$, obtenus par radio-HPLC, avant et 2 h après leur injection aux souris sont présentés sur la figure 82. Pour chaque nanobody radiomarqué, $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$, un seul pic majeur sans changement de temps de rétention avant ou après l'injection aux souris, a été observé. L'absence de produits radioactifs intermédiaires sur le profil confirme la stabilité *in vivo* de $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$.

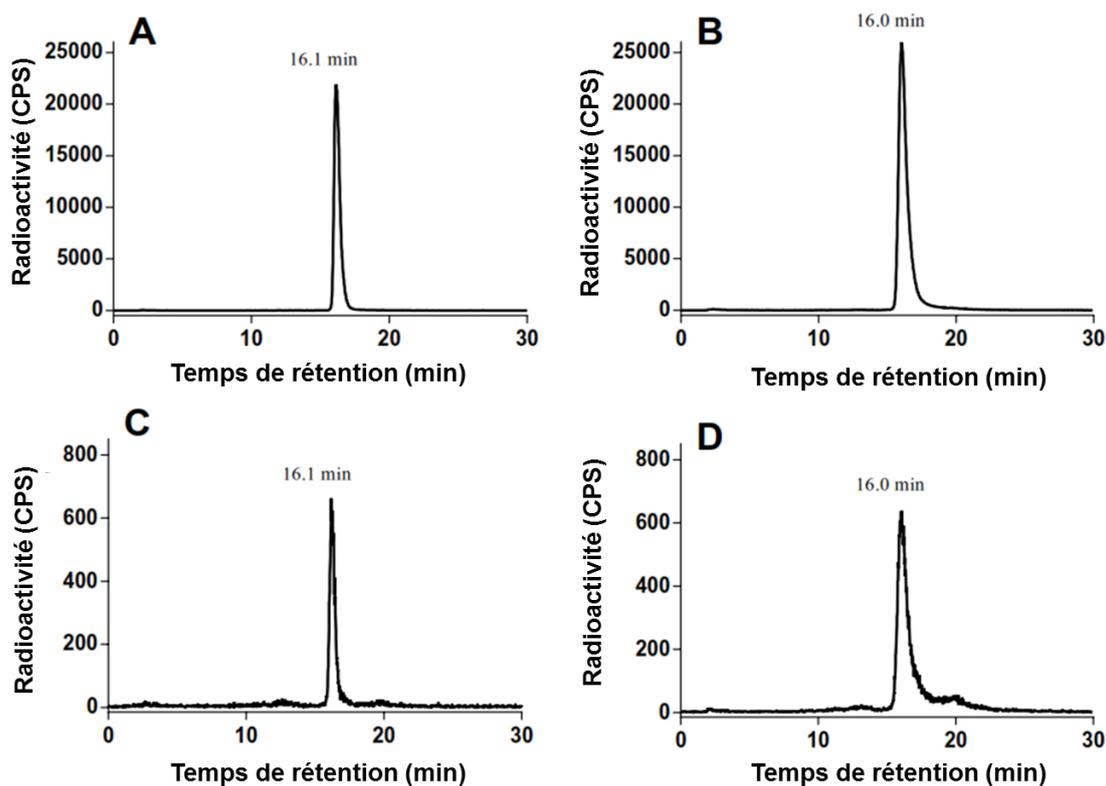


Figure 82. Profils de radio-HPLC de $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$ immédiatement après radiomarquage (A et B, respectivement) et 2 h après injection à la souris (C et D respectivement).

➤ Stabilité *in vitro* dans le sang humain et profils de distribution

Les profils de distribution de $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$ *in vitro* dans le sang humain sont présentés dans la figure 83. $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$ sont faiblement liés aux globules rouges et aux protéines plasmatiques, avec des taux qui restent stables au cours du temps : 14-20 % pour $^{99m}\text{Tc-A1}$ et 10-18 % pour $^{99m}\text{Tc-C6}$. La majeure partie de $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$ (63-75 %) est retrouvée dans la partie du plasma dépourvu de grosses protéines.

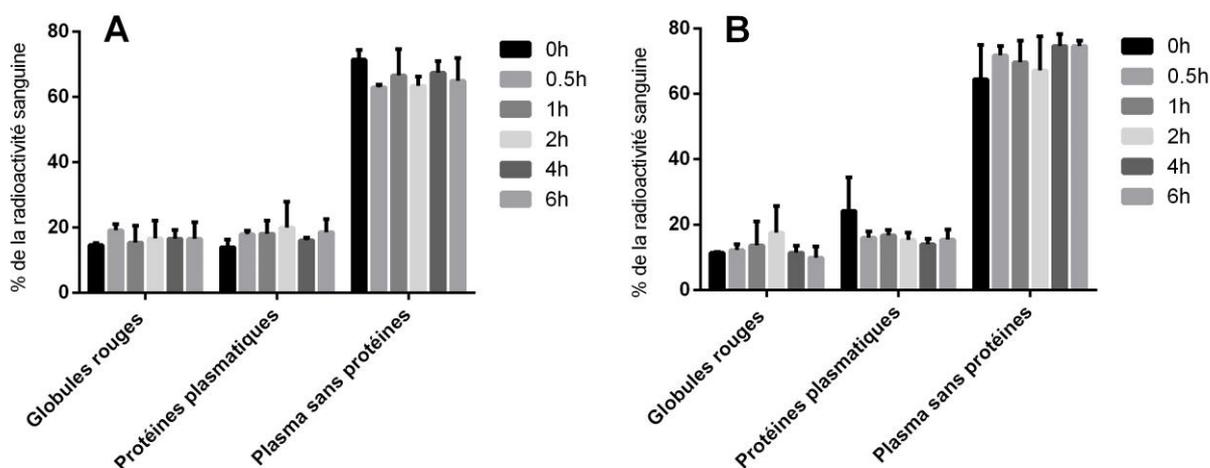


Figure 83. Profils de distribution de $^{99m}\text{Tc-A1}$ (A) et $^{99m}\text{Tc-C6}$ (B) *in vitro* dans le sang humain. Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité du sang total.

La fraction de plasma dépourvue de grosses protéines a ensuite été analysée par radio-HPLC afin de déterminer la stabilité de $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$. Les deux nanobodies radiomarqués sont stables jusqu'à 6 h d'incubation dans le sang humain avec une PRC > 98 % aux différents temps (tableau 11).

Temps	0 h	0,5 h	1 h	2 h	4 h	6 h
$^{99m}\text{Tc-A1}$	99,8 ± 0,1	99,8 ± 0,1	99,7 ± 0,1	99,2 ± 0,6	98,7 ± 0,3	98,8 ± 0,5
$^{99m}\text{Tc-C6}$	99,6 ± 0,1	99,6 ± 0,1	99,2 ± 0,3	98,6 ± 0,4	98,2 ± 0,3	98,0 ± 0,2

Tableau 11. Stabilité *in vitro* de $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$ dans le sang humain.

1.2 Evaluation de $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$ *in vivo* chez la souris

Les deux nanobodies $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$ ont ensuite été évalués *in vivo* pour leur capacité à lier les tumeurs exprimant la MSLN. Les souris BALB/c Nude ont été implantées avec des cellules HCC70 ou MDA-MB-231 en sous-cutanée.

➤ Suivi du volume tumoral

Les tumeurs des souris ont été quotidiennement mesurées durant l'étude. Il a été possible de mesurer les tumeurs dès 6 jours après l'implantation tumorale. Le temps de génération (TG) des deux lignées a été déterminé. Il est de 7,5 jours pour la lignée HCC70 et de 15,3 jours pour la lignée MDA-MB-231 (figure 84). En 3-4 semaines, les tumeurs ont atteint un volume d'approximativement 300 mm³, permettant de réaliser les études d'imagerie et de biodistribution.

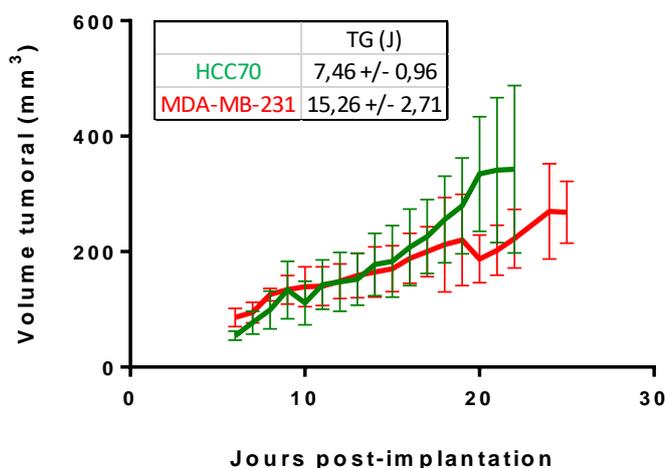


Figure 84. Suivi de la croissance tumorale des lignées HCC70 et MDA-MB-231 xéno greffées sur la souris BALB/c Nude. TG : Temps de génération.

1.2.1 Imagerie TEMP

➤ Acquisition TEMP/TDM

Trois semaines après l'implantation tumorale, les souris ont été injectées avec $^{99m}\text{Tc-A1}$, $^{99m}\text{Tc-C6}$ ou $^{99m}\text{Tc-Ctle}$. Une heure après l'injection, les souris ont été imagées en TDM, qui apporte une information sur l'anatomie, puis en imagerie TEMP afin de déterminer la biodistribution des traceurs. Les clichés de ces imageries fusionnées sont représentés dans la figure 85 ci-dessous, avec des coupes sagittales, coronales et transversales. En niveau de gris est présentée l'imagerie

anatomique (TDM) et en échelle de couleur est présentée l'imagerie nucléaire (TEMP), avec une échelle allant de 0,5 à 8 % DI/cm³.

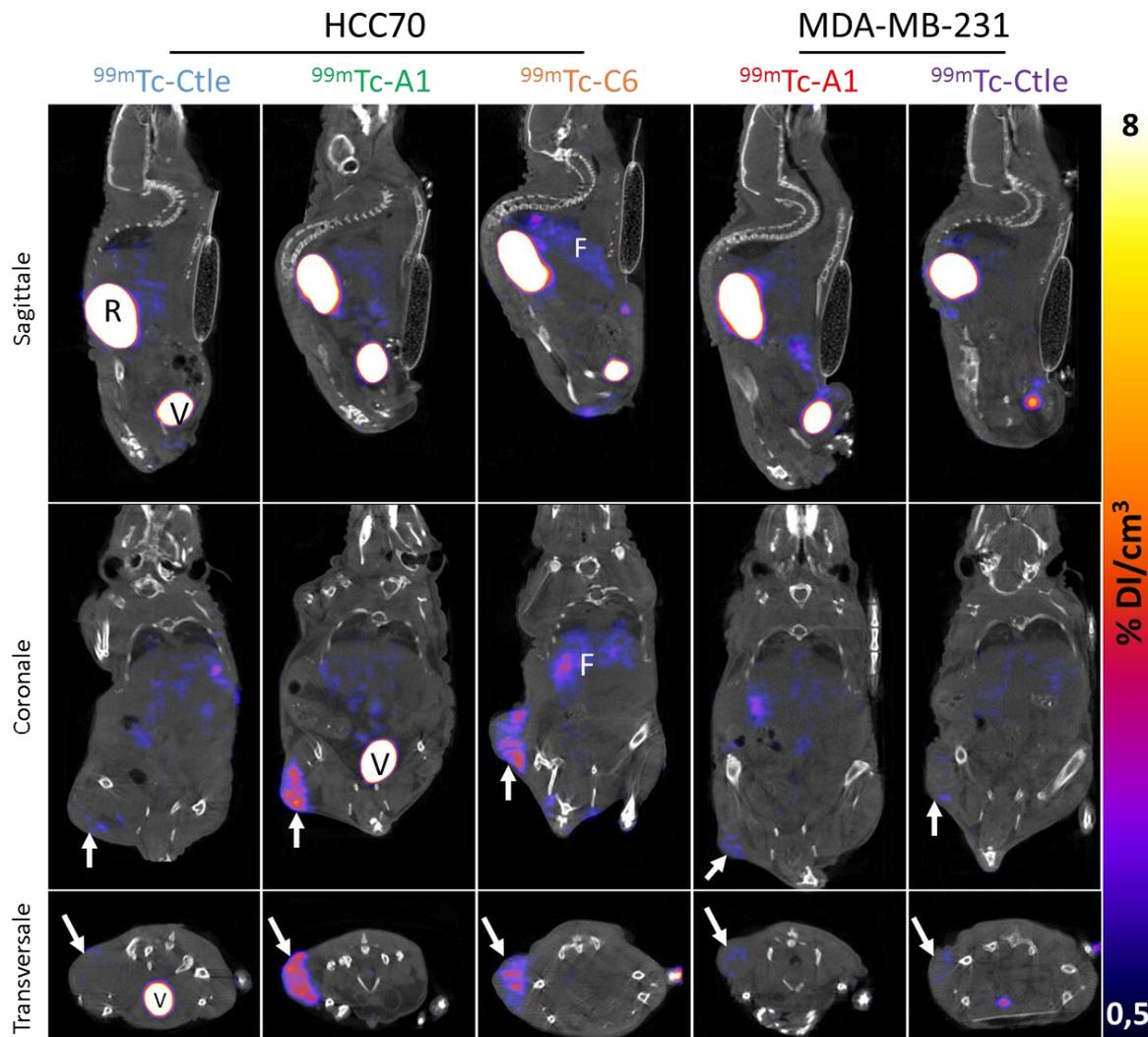


Figure 85. Imagerie TEMP/TDM des souris BALB/c Nude porteuses de tumeurs HCC70 et MDA-MB-231 injectées avec les nanobodies ^{99m}Tc-ctle, ^{99m}Tc-A1, ^{99m}Tc-C6. Les imageries TEMP/TDM ont été réalisées 1 h après l'injection des traceurs. Des coupes sagittales, coronales et transversales sont présentées ici. Les flèches blanches pointent la tumeur greffée en sous-cutanée. F : Foie ; R : Rein ; V : Vessie.

Sur la coupe sagittale, une élimination des traceurs par la voie urinaire est clairement identifiable : un fort signal est en effet détectable dans les reins (R), ainsi que dans la vessie (V). Le traceur ^{99m}Tc-ctle ne s'accumule que très peu au sein des tumeurs HCC70 ou MDA-MB-23. Il est aussi clairement visible que le traceur ^{99m}Tc-A1 se fixe au sein des tumeurs HCC70 alors qu'il ne s'accumule pas

dans les tumeurs MDA-MB-231. L'accumulation du traceur $^{99m}\text{Tc-C6}$ dans les tumeurs HCC70 est également bien identifiable, toutefois la fixation de celui-ci semble moins importante que la fixation de $^{99m}\text{Tc-A1}$. De plus, $^{99m}\text{Tc-C6}$ semble s'accumuler dans le tissu hépatique (F) de façon plus prononcée que $^{99m}\text{Tc-A1}$.

➤ Quantification des images TEMP/TDM

Les fixations tumorales de $^{99m}\text{Tc-A1}$, $^{99m}\text{Tc-C6}$ et $^{99m}\text{Tc-Ctle}$ ont été déterminées par une quantification réalisée sur la base des imageries TEMP/TDM (figure 86). Que ce soit dans les tumeurs HCC70 ou MDA-MB-231, la fixation tumorale de $^{99m}\text{Tc-ctle}$ est faible ($0,47 \pm 0,13$ % DI/cm³ vs $0,66 \pm 0,15$ % DI/cm³, NS). $^{99m}\text{Tc-A1}$ est 5 fois plus fixé par les tumeurs HCC70 que par les tumeurs MDA-MB-231 ($p < 0,01$). Par ailleurs, $^{99m}\text{Tc-A1}$ est plus de 5 fois plus fixé par les tumeurs HCC70 que $^{99m}\text{Tc-ctle}$ ($2,60 \pm 0,68$ vs $0,47 \pm 0,13$ % DI/g, $p < 0,001$). Si $^{99m}\text{Tc-C6}$ est 3 fois plus fixé par la tumeur HCC70 que le $^{99m}\text{Tc-ctle}$ ($1,60 \pm 0,5$ vs $0,47 \pm 0,13$ %DI/g, $p < 0,001$), il est en revanche près de 2 fois moins fixé par la tumeur HCC70 que le traceur $^{99m}\text{Tc-A1}$ ($p < 0,01$).

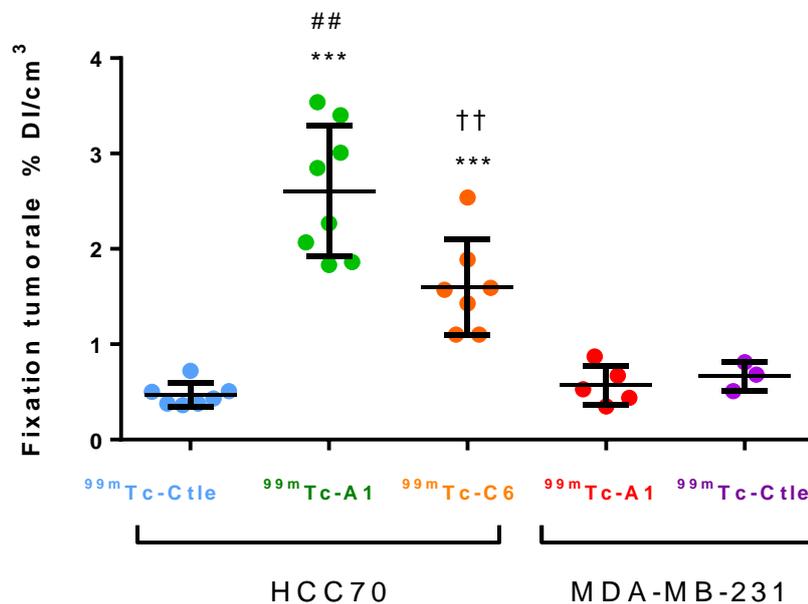


Figure 86. Evaluation des fixations de $^{99m}\text{Tc-A1}$, $^{99m}\text{Tc-C6}$ et $^{99m}\text{Tc-ctle}$ sur des tumeurs HCC70 et MDA-MB-231 xéno-greffées en sous-cutanée sur la souris BALB/c Nude. *** $p < 0,001$ vs HCC70- $^{99m}\text{Tc-Ctle}$; ## $p < 0,01$ vs MDA-MB-231- $^{99m}\text{Tc-A1}$; †† $p < 0,01$ vs HCC70- $^{99m}\text{Tc-A1}$.

1.2.2 Etudes de biodistribution

Les résultats des biodistributions réalisées par prélèvements d'organes 2 h après l'injection des traceurs et 1 h après l'imagerie TEMP sont présentés dans le tableau ci-dessous (tableau 12). Comme nous avons pu l'observer sur les images TEMP, une importante fixation rénale est retrouvée (> 200 % DI/g pour tous les groupes). Quels que soient les organes étudiés, à l'exception des reins et de la tumeur, la captation de $^{99m}\text{Tc-A1}$ est toujours inférieure à 1 % DI/g. Tout comme l'ont montré les quantifications réalisées sur les images TEMP, $^{99m}\text{Tc-A1}$ est 7 fois plus fixé par les tumeurs HCC70 que le $^{99m}\text{Tc-ctle}$ ($2,34 \pm 0,36$ % DI/g vs $0,34 \pm 0,05$ % DI/g, $p < 0,001$). $^{99m}\text{Tc-A1}$ est également 5 fois plus fixé par cette tumeur que par la tumeur MDA-MB-231 ($2,34 \pm 0,36$ % DI/g vs $0,48 \pm 0,18$ % DI/g % DI/g, $p < 0,001$). $^{99m}\text{Tc-A1}$ ne se fixe que très peu dans tous les autres organes avec des fixations toujours < 1 % DI/g.

Organes	HCC70 $^{99m}\text{Tc-Ctle}$ (n=7)	HCC70 $^{99m}\text{Tc-A1}$ (n=8)	HCC70 $^{99m}\text{Tc-C6}$ (n=7)	MDA-MB-231 $^{99m}\text{Tc-A1}$ (n=6)	MDA-MB-231 $^{99m}\text{Tc-Ctle}$ (n=4)
Cerveau	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,01 ^{#*}
Estomac	0,35 ± 0,14	0,42 ± 0,06	0,67 ± 0,24 ^{***†}	0,43 ± 0,07	0,47 ± 0,07
Intestin	0,29 ± 0,10	0,36 ± 0,08	0,58 ± 0,30 ^{***†}	0,30 ± 0,08	0,31 ± 0,18
Foie	0,66 ± 0,15	0,74 ± 0,18 [#]	1,25 ± 0,19 ^{***†}	0,58 ± 0,06	0,87 ± 0,06 ^{###*}
Pancréas	0,16 ± 0,05	0,27 ± 0,07 ^{**#}	0,22 ± 0,03	0,18 ± 0,03	0,20 ± 0,06
Gl, Salivaires	0,28 ± 0,12	0,29 ± 0,10	0,28 ± 0,07	0,25 ± 0,05	0,36 ± 0,06 [#]
Graisse blanche	0,15 ± 0,09	0,28 ± 0,08	0,29 ± 0,06	0,27 ± 0,13	0,17 ± 0,09
Graisse brune	0,22 ± 0,11	0,18 ± 0,05	0,20 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,30 ± 0,10 [#]
Coeur	0,24 ± 0,11	0,23 ± 0,04 ^{##}	0,20 ± 0,04	0,15 ± 0,05	0,32 ± 0,05 ^{##}
Poumons	0,68 ± 0,24	0,61 ± 0,10	0,80 ± 0,11	0,56 ± 0,27	1,54 ± 0,60 ^{###*}
Rein	264,56 ± 31,77	268,81 ± 16,49 ^{##}	255,21 ± 41,80	233,21 ± 13,14	289,78 ± 34,96 [#]
Peau	0,42 ± 0,16	0,58 ± 0,13	0,44 ± 0,10 [†]	0,49 ± 0,14	0,52 ± 0,11
Os	0,22 ± 0,07	0,22 ± 0,02 [#]	0,21 ± 0,04	0,16 ± 0,01	0,29 ± 0,05 ^{##}
Ovaires	0,42 ± 0,19	0,50 ± 0,14	0,61 ± 0,09	0,44 ± 0,18	0,55 ± 0,07
Tractus génital	0,47 ± 0,18	0,50 ± 0,14	0,53 ± 0,09	0,39 ± 0,08	0,60 ± 0,06 ^{##}
Rate	0,28 ± 0,08	0,40 ± 0,10	0,51 ± 0,06	0,32 ± 0,05	0,43 ± 0,05 ^{**}
Ganglions	0,50 ± 0,35	0,44 ± 0,16	0,42 ± 0,04	0,33 ± 0,06	0,46 ± 0,14
Sang	0,42 ± 0,24	0,25 ± 0,10	0,28 ± 0,07	0,19 ± 0,10	0,63 ± 0,06 ^{##}
Muscle	0,10 ± 0,04	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,13 ± 0,02 [#]
Tumeur	0,34 ± 0,05	2,34 ± 0,36^{#####}	1,56 ± 0,43^{#####}	0,48 ± 0,18	0,62 ± 0,15^{**}

Tableau 12. Biodistribution réalisée 2 h après l'injection de $^{99m}\text{Tc-A1}$, $^{99m}\text{Tc-C6}$ et $^{99m}\text{Tc-Ctle}$ chez les souris BALB/c Nude xénotransplantées avec des tumeurs HCC70 et MDA-MB-231. Les résultats sont exprimés en % DI/g d'organes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$ vs HCC70- $^{99m}\text{Tc-Ctle}$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ vs MDA-MB-231- $^{99m}\text{Tc-A1}$; †† $p < 0,01$ vs HCC70- $^{99m}\text{Tc-A1}$.**

Concernant $^{99m}\text{Tc-C6}$, il est 5 fois plus fixé par la tumeur HCC70 que le $^{99m}\text{Tc-Ctle}$ ($p < 0,001$). Cependant sa fixation tumorale est 1,5 moins importante que celle de $^{99m}\text{Tc-A1}$ ($p < 0,01$). Comme observé sur les images TEMP, les fixations hépatique et intestinale de $^{99m}\text{Tc-C6}$ sont significativement plus importantes que celle de $^{99m}\text{Tc-A1}$ ($p < 0,01$).

1.2.3 Corrélation TEMP/Biodistribution et détermination des rapports de fixation

➤ Corrélation TEMP/Biodistribution

Les quantifications réalisées sur la base des images TEMP sont significativement corrélées à celles obtenues par prélèvements d'organes (biodistribution *ex vivo*) (figure 87) ($p < 0,001$). Ceci valide la méthode de quantification des images TEMP employée.

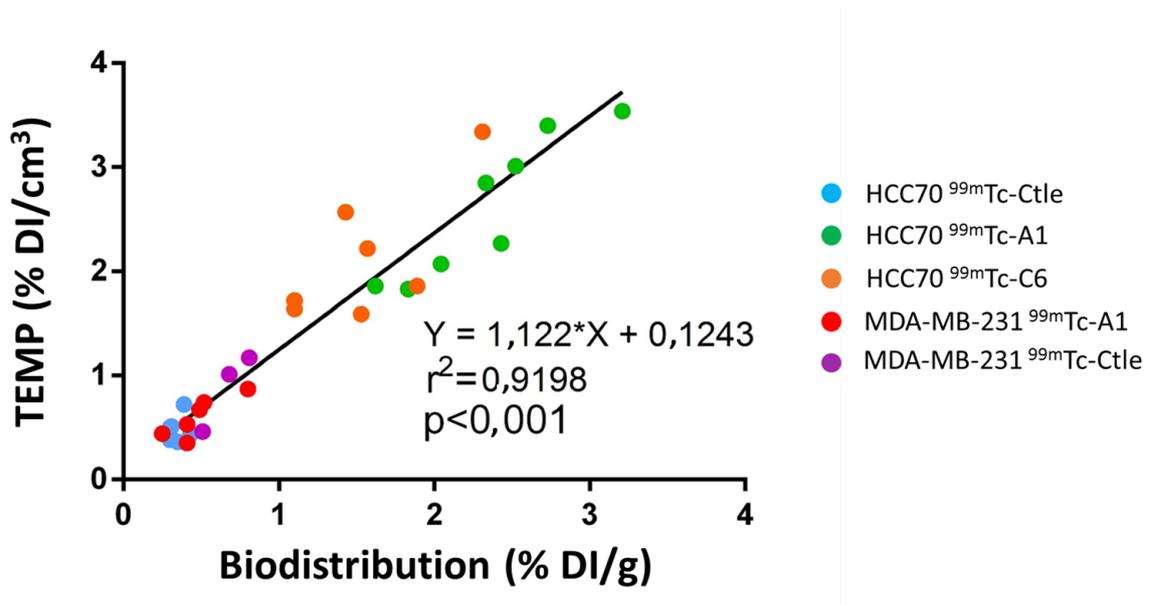


Figure 87. Corrélation entre les fixations tumorales déterminées par quantification TEMP *in vivo* ou par prélèvements d'organes.

➤ Rapport Tumeur/Muscle et Tumeur/Sang

Les rapports de fixation Tumeur/Muscle (T/M) et Tumeur/Sang (T/S) ont été déterminés dans les différents groupes en se basant sur la quantification des

images TEMP ou sur la biodistribution par prélèvements d'organes. Ces rapports sont essentiels en imagerie pré-clinique et clinique, où la capacité à visualiser une tumeur ou une métastase est fortement dépendante du niveau de contraste entre la cible et les tissus environnants. Des résultats comparables ont été obtenus en se basant sur la quantification des images TEMP/TDM ou sur la biodistribution par prélèvements d'organes (figure 88). Le meilleur rapport T/M a été obtenu pour le groupe de souris implantées avec les tumeurs HCC70 et injectées avec le nanobody $^{99m}\text{Tc-A1}$, avec un rapport T/M > 20, alors que pour le groupe HCC70-Ctle, celui-ci était inférieur à 4 ($p < 0,001$). Ce rapport est également élevé pour le groupe HCC70 injecté avec le nanobody $^{99m}\text{Tc-C6}$ (>12) et significativement supérieur à celui déterminé pour le groupe HCC70- $^{99m}\text{Tc-ctle}$ ($p < 0,01$). Il est cependant plus faible que celui observé pour les mêmes tumeurs injectées avec $^{99m}\text{Tc-A1}$ ($p < 0,05$).

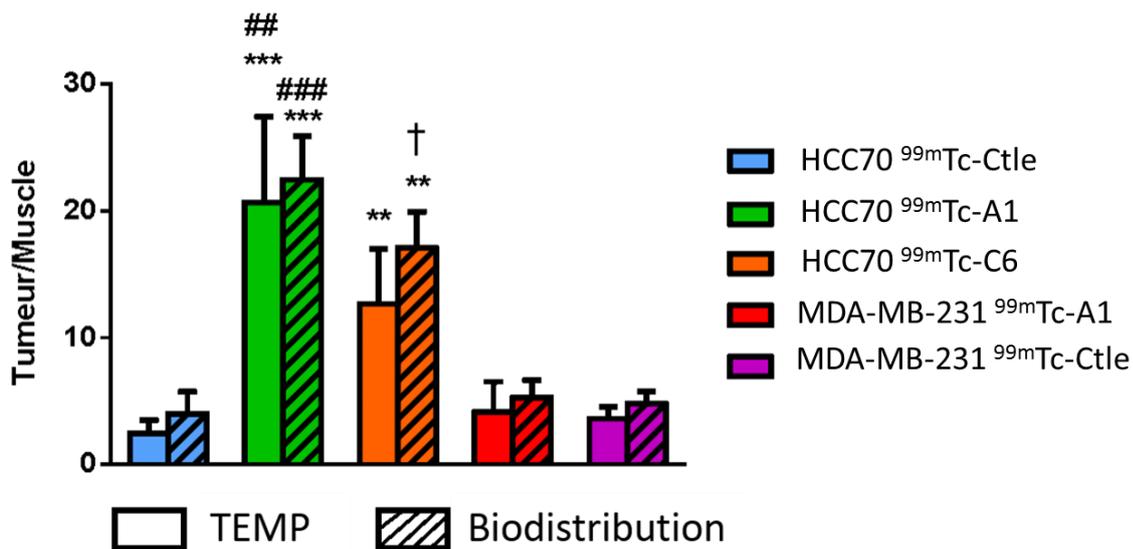


Figure 88. Rapports de fixation tumeur/muscle des traceurs. Les rapports de fixation ont été établis après quantification des images TEMP *in vivo* et des quantifications réalisées en biodistribution *ex vivo*. ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$ vs HCC70 $^{99m}\text{Tc-Ctle}$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ vs MDA-MB-231 $^{99m}\text{Tc-A1}$; † $p < 0,05$ vs HCC70 $^{99m}\text{Tc-A1}$.**

Les rapports de fixation entre la tumeur et le sang ont également été déterminés (figure 89). Chez les souris porteuses de tumeurs HCC70, le rapport T/S de $^{99m}\text{Tc-A1}$ est 10 fois supérieur à celui établi pour le $^{99m}\text{Tc-Ctle}$ ($10,3 \pm 4,4$ vs

1,1 ± 0,6 ; p<0,001). Il est également 3 fois supérieur à celui déterminé chez les souris porteuses de tumeurs MDA-MB-231 (10,3 ± 4,4 vs 3,3 ± 2,2 ; p<0,001).

Concernant le ^{99m}Tc -C6, chez les souris porteuses de tumeurs HCC70, le rapport T/S est près de 6 fois supérieur à celui du ^{99m}Tc -Ctle (p<0,001) et 2 fois inférieur à celui de ^{99m}Tc -A1 (p<0,01). Les deux nanobodies, ^{99m}Tc -A1 et ^{99m}Tc -C6 permettent une visualisation de la tumeur avec un contraste élevé.

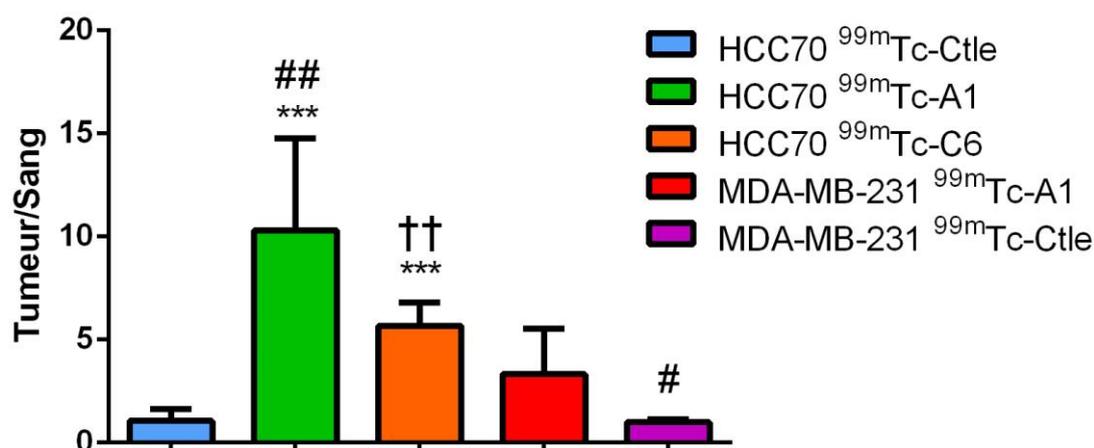


Figure 89. Rapports de fixation Tumeur/Sang des traceurs. Les rapports de fixation ont été établis après une quantification réalisée en biodistribution par prélèvements d'organes. *** p<0,001 vs HCC70 ^{99m}Tc -Ctle ; # p<0,05 ; ## p<0,01 vs MDA-MB-231 ^{99m}Tc -A1 ; †† p<0,01 vs HCC70 ^{99m}Tc -A1.

En accord avec les études réalisées *in vitro* après le radiomarquage, les études *in vivo* confirment que le ^{99m}Tc -A1 est un traceur plus pertinent pour l'imagerie de tumeurs exprimant la MSLN. En effet, sa fixation tumorale est supérieure à celle de ^{99m}Tc -C6 et son profil de distribution est plus favorable à l'imagerie.

Par conséquent, pour la suite des études, seul le ^{99m}Tc -A1 a été utilisé.

1.3 Études de compétition *in vivo*

Des études de compétition *in vivo* ont été menées dans le but de vérifier la spécificité de liaison du nanobody retenu, ^{99m}Tc -A1, aux tumeurs exprimant la

MSLN. Des souris BALB/c Nude porteuses de tumeurs HCC70 ont été injectées avec ^{99m}Tc -A1 ou ^{99m}Tc -A1 plus un excès de 150 fois de A1 non radiomarqué.

➤ Imagerie TEMP et quantification

Des imageries TEMP/TDM ont d'abord été réalisées 1 h après l'injection du radiotracer (figure 90). La fixation de ^{99m}Tc -A1 au sein de la tumeur est clairement identifiable sur les coupes coronale et sagittale pour le groupe de souris injectées uniquement avec ^{99m}Tc -A1. Il est par ailleurs facilement visible que l'ajout d'un excès de A1 non marqué inhibe totalement la fixation de ^{99m}Tc -A1 au sein de la tumeur HCC70. Aucun signal n'est en effet visible au sein des tumeurs sur les images TEMP. Ceci permet de démontrer la spécificité de liaison de ^{99m}Tc -A1 aux tumeurs exprimant la MSLN *in vivo*.

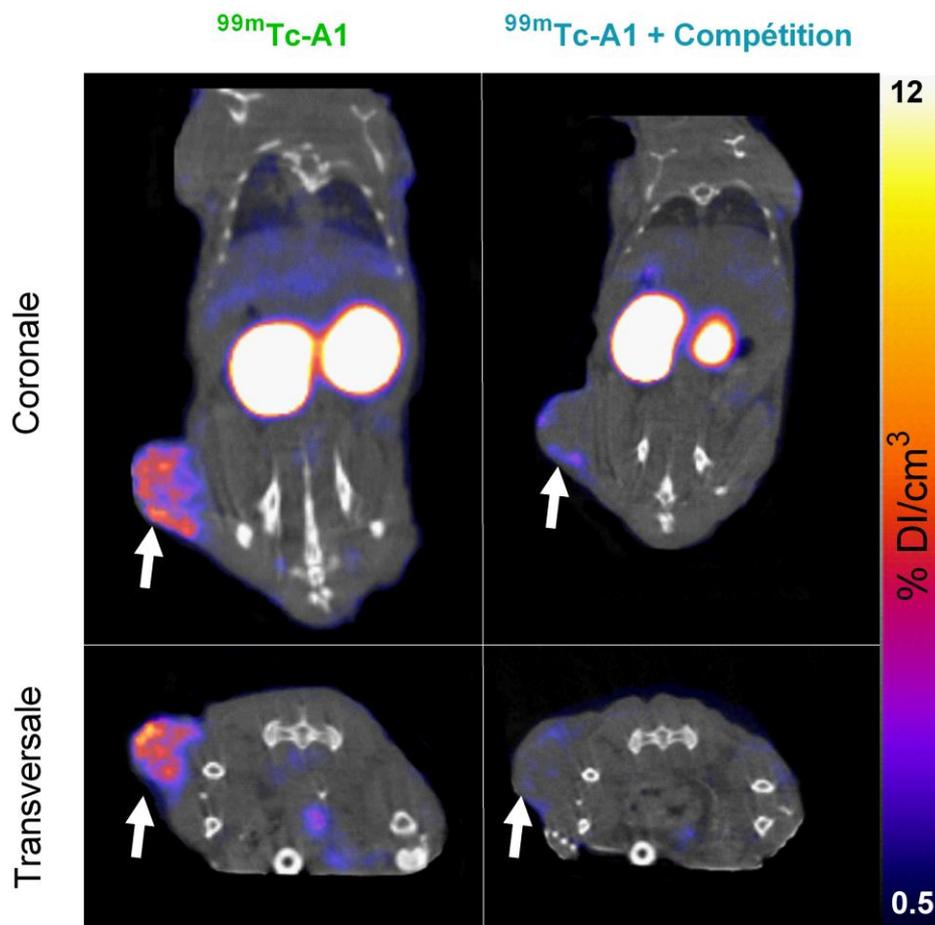


Figure 90. Images représentatives TEMP/TDM des souris BALB/c Nude porteuses de tumeurs HCC70, injectées avec ^{99m}Tc -A1 en présence ou non d'un excès de 150 fois de nanobody A1 non marqué. Les tumeurs HCC70 sont indiquées par la flèche blanche.

➤ Etude de biodistribution

A l'issue de l'imagerie TEMP, soit 2 h après l'injection, des études de biodistribution par prélèvements d'organes ont été réalisées sur ces souris (tableau 13). Pour tous les organes prélevés, à l'exception de la tumeur et du rein, aucune différence de fixation n'a été observée entre les deux groupes, ce qui suggère que la faible fixation de $^{99m}\text{Tc-A1}$ dans ces organes est non spécifique. Concernant l'activité rénale, celle-ci est 1,5 fois inférieure dans le groupe des souris co-injectées avec $^{99m}\text{Tc-A1}$ et le compétiteur par comparaison au groupe de souris seulement injecté avec le $^{99m}\text{Tc-A1}$ ($p < 0,05$). Ceci est probablement dû à la saturation des sites de recapture des nanobodies dans le cortex rénal, par les charges positives apportées par l'excès de nanobody A1 non marqué. Si l'on s'intéresse à l'activité tumorale, l'ajout d'un excès de nanobody A1 non marqué inhibe totalement la fixation du traceur $^{99m}\text{Tc-A1}$, démontrant la spécificité de la liaison dans les tumeurs exprimant la MSLN. En effet, l'activité tumorale de $^{99m}\text{Tc-A1}$ a diminué d'environ 8 fois lors de l'ajout du compétiteur ($p < 0,001$). Par comparaison à l'étude de biodistribution (partie 2.2), il est intéressant de noter que la fixation du traceur $^{99m}\text{Tc-A1}$ était 1,5 plus importante ici (4,23 vs 2,60 % DI/g lors de l'étude de biodistribution).

Organes	HCC70 $^{99m}\text{Tc-A1}$ (n=5)	HCC70 $^{99m}\text{Tc-A1}$ + Compétition (n=5)
Cerveau	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Estomac	0,59 ± 0,15	0,49 ± 0,23
Intestin	0,52 ± 0,30	0,42 ± 0,28
Foie	0,95 ± 0,24	0,72 ± 0,33
Pancréas	0,28 ± 0,03	0,19 ± 0,06
Gl. Salivaires	0,36 ± 0,06	0,27 ± 0,07
Graisse blanche	0,34 ± 0,12	0,17 ± 0,06
Graisse brune	0,26 ± 0,10	0,24 ± 0,07
Coeur	0,21 ± 0,08	0,22 ± 0,08
Poumons	0,79 ± 0,25	0,65 ± 0,29
Rein	270,12 ± 15,70*	180,76 ± 28,69
Peau	0,81 ± 0,34	0,86 ± 0,19
Os	0,23 ± 0,07	0,28 ± 0,15
Ovaires	0,67 ± 0,19	0,50 ± 0,13
Tractus génital	0,63 ± 0,24	0,45 ± 0,18
Rate	0,47 ± 0,11	0,33 ± 0,08
Ganglions	0,63 ± 0,11	0,56 ± 0,13
Sang	0,30 ± 0,13	0,25 ± 0,14
Muscle	0,14 ± 0,04	0,15 ± 0,05
Tumeur	4,23 ± 0,83**	0,54 ± 0,10
Tumeur / Sang	12,70 ± 5,20	3,01 ± 1,66
Tumeur / Muscle	31,26 ± 9,98	3,78 ± 1,20

Tableau 13. Biodistribution de $^{99m}\text{Tc-A1}$ en présence ou non d'un excès d'A1 non marqué, chez des souris BALB/c Nude porteuses de tumeurs HCC70. Une biodistribution a été réalisée 2 h après l'injection de $^{99m}\text{Tc-A1}$ avec ou sans excès de 150 fois d'A1 non marqué. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs HCC70 + Compétition.

3. Etudes *ex vivo*

Après les études réalisées *in vivo*, les tumeurs ont directement été congelées et des études *post-mortem* par Western Blot et IHC ont été réalisées.

3.1 Mesure d'expression de la mésothéline

3.1.1 Western Blot

Des extraits tumoraux des différents groupes ont été lysés et l'expression de la MSLN a été évaluée par Western Blot. Les résultats indiquent que le statut MSLN déterminé *in vitro* a été conservé *in vivo* après implantation chez les souris. En effet, les tumeurs HCC70 expriment la MSLN alors que les tumeurs MDA-MB-231 ne l'expriment pas (figure 92).

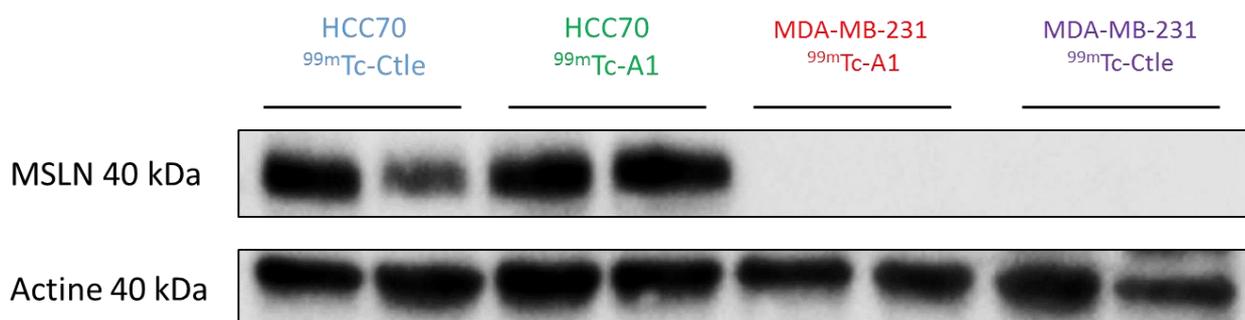


Figure 92. Détermination de l'expression de la MSLN dans les tumeurs HCC70 et MDA-MB-231 greffées sur des souris BALB/c Nude, en Western Blot.

➤ [Comparaison de l'expression de la MSLN entre les études de biodistribution et de compétition](#)

Pour comprendre d'où provenait la différence de fixation de ^{99m}Tc-A1 au sein des tumeurs HCC70 entre l'étude initiale de biodistribution (2,6 % DI/g) et l'étude de compétition (4,23 % DI/g), des études en Western Blot ont été menées. Trois tumeurs issues de chaque étude ont été broyées et l'expression de la MSLN a été évaluée. L'expression de la MSLN est plus importante pour les tumeurs de l'étude de compétition que pour celles de l'étude de biodistribution (figure 93).



Figure 93. Mesure de l'expression de la MSLN dans des tumeurs issues de l'étude de biodistribution et de celles issues de l'étude de compétition. Quarante (40) μg de protéines de chaque extrait tumoral ont été déposés sur le gel. Trois extraits protéiques de tumeurs issues de chaque étude ont été analysés.

Une quantification relative de l'expression de la MSLN a été réalisée. L'intensité de signal des bandes de la membrane a été quantifiée par le logiciel ImageJ. Le ratio MSLN/cofiline est près de 1,5 fois plus important dans le cas de l'étude de compétition que lors de l'étude de biodistribution (figure 94). Pour rappel, la fixation tumorale de $^{99\text{m}}\text{Tc-A1}$ est près de 1,5 fois plus élevée dans l'étude de compétition que dans l'étude de biodistribution.

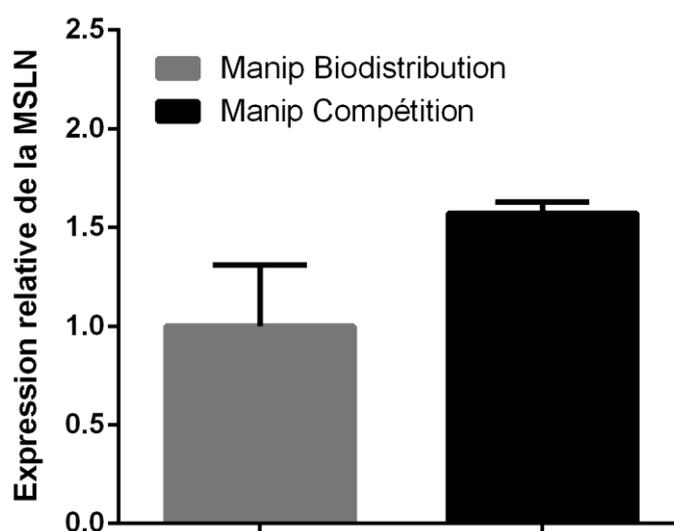


Figure 94. Quantification de l'expression de la MSLN des tumeurs issues de l'étude de biodistribution et celles de l'étude de compétition.

La fixation du traceur $^{99m}\text{Tc-A1}$ au sein des tumeurs HCC70 est significativement corrélée au niveau d'expression de la MSLN ($p < 0,01$, figure 95). L'augmentation du niveau d'expression de la cible MSLN pourrait ainsi expliquer les différences de fixation de $^{99m}\text{Tc-A1}$ entre l'étude de biodistribution et l'étude de compétition.

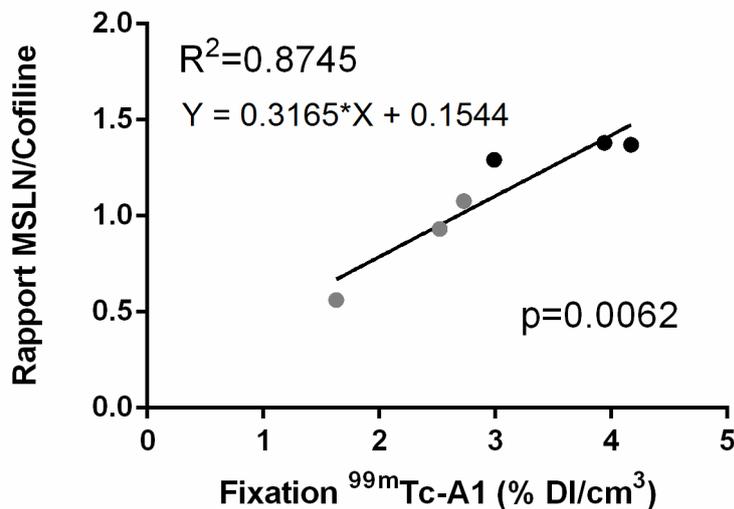


Figure 95. Corrélation entre l'expression de la MSLN et la fixation de $^{99m}\text{Tc-A1}$. La mesure de l'expression de MSLN a été réalisée à partir de la mesure de la densité des bandes du WB grâce au logiciel ImageJ, et celle-ci a été corrélée à la fixation tumorale (TEMP). Les points gris représentent l'étude de biodistribution et les noirs l'étude de compétition.

3.1.2 Immunohistochimie

Des études en IHC ont également été réalisées pour confirmer l'expression de la MSLN par les tumeurs HCC70, mais également pour déterminer la localisation de celle-ci à l'échelle tissulaire. Ces IHC ont été réalisées avec un anticorps commercial mais également avec le nanobody anti-MSLN A1.

➤ [Anticorps commercial](#)

Comme il a pu être montré par Western Blot, les tumeurs HCC70 expriment la MSLN alors que les MDA-MB-231 ne l'expriment pas. On peut remarquer un marquage homogène et plutôt membranaire sur les coupes de tumeurs HCC70, et aucun marquage au sein des tumeurs MDA-MB-231 (figure 96).

HCC70

MDA-MB-231

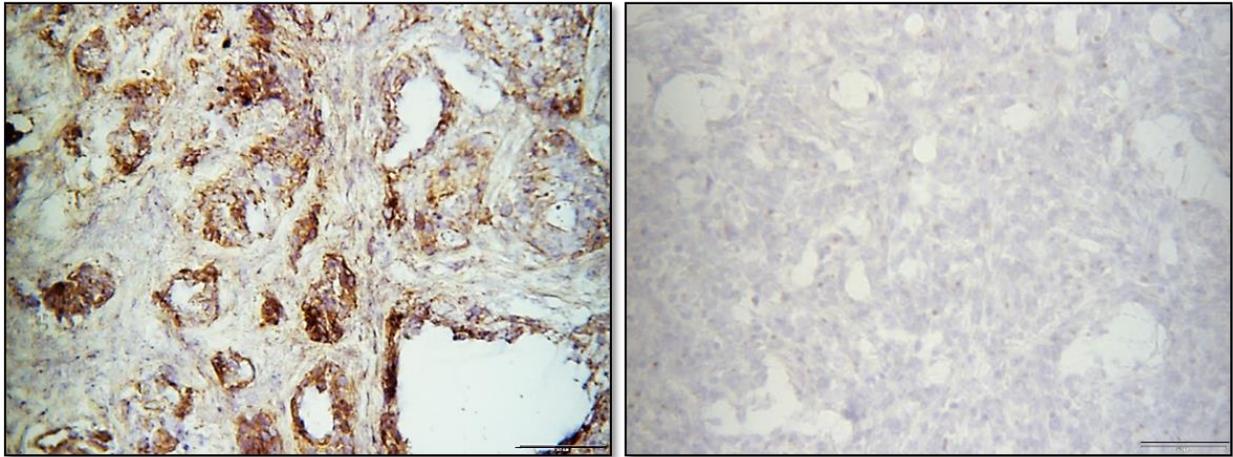


Figure 96. IHC anti-MSLN réalisée sur les tumeurs HCC70 et MDA-MB-231 avec un anticorps commercial. La barre d'échelle représente 50 μ m.

➤ [Nanobody A1](#)

L'IHC réalisée avec le nanobody A1 montre sensiblement le même résultat qu'avec l'anticorps commercial, avec un marquage plutôt membranaire des cellules tumorales HCC70 (figure 97). Aucun marquage cellulaire n'est présent sur les coupes de tumeurs MDA-MB-231. En plus de la validation de ^{99m}Tc -A1 pour réaliser l'imagerie de tumeurs exprimant la MSLN, l'utilisation du nanobody A1 est donc validée pour l'IHC sur des coupes de tumeurs congelées.

HCC70

MDA-MB-231

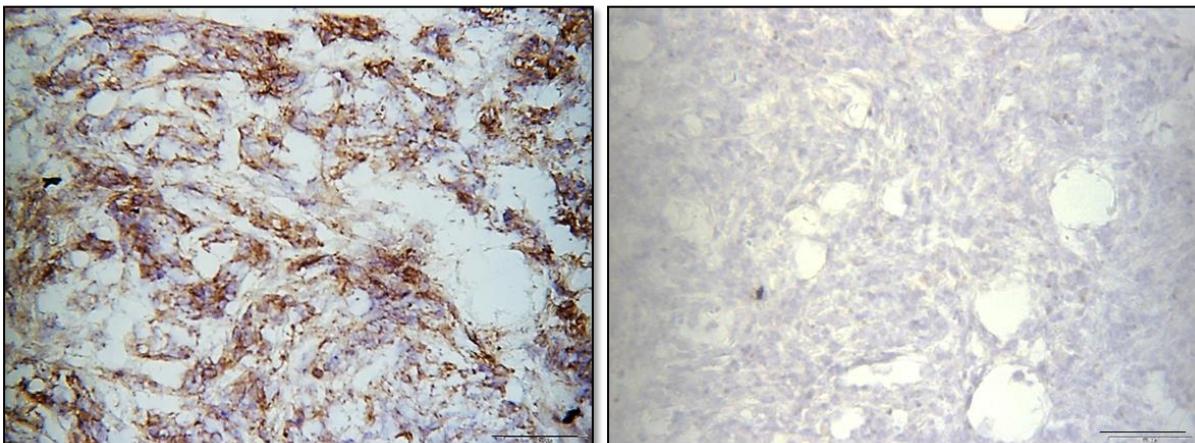


Figure 97. IHC anti-MSLN réalisée sur les tumeurs HCC70 et MDA-MB-231 avec le nanobody A1. La barre d'échelle représente 50 μ m.

Bilan des manipulations *in vivo*

Au cours de cette deuxième partie dédiée à l'évaluation *in vivo* des nanobodies ^{99m}Tc -A1 et ^{99m}Tc -C6, nous avons pu montrer que ces **2 nanobodies étaient stables *in vivo*** dans le sang de souris et *in vitro* dans le sang humain au cours du temps. De plus, la majeure partie de ^{99m}Tc -A1 et ^{99m}Tc -C6 est retrouvée dans la fraction libre du sang, permettant une bonne biodisponibilité des radiotraceurs, et favorisant une clairance rapide de ceux-ci. Les études de biodistribution ont permis de confirmer l'élimination rapide des nanobodies du sang, avec une activité sanguine $< 0,5 \%$ DI/g 2 h après l'injection chez la souris pour les 2 nanobodies. ^{99m}Tc -A1 et ^{99m}Tc -C6 ont montré une bonne capacité à lier *in vivo* les tumeurs HCC70 exprimant la MSLN, et ne s'accumulent pas dans les tumeurs MDA-MB-231 n'exprimant pas cette cible. L'imagerie TEMP à l'aide de ^{99m}Tc -A1 et ^{99m}Tc -C6 a été réalisée avec succès. Nous avons pu montrer que **^{99m}Tc -A1 pourrait être un meilleur agent d'imagerie que ^{99m}Tc -C6** : sa plus forte accumulation au sein des tumeurs HCC70 et sa plus faible distribution au sein des organes digestifs sont des avantages non négligeables en vue d'un éventuel transfert en clinique. **Les études de compétition menées *in vivo* avec ^{99m}Tc -A1 ont permis de démontrer la spécificité de liaison de cet agent d'imagerie.** *Ex vivo*, nous avons pu confirmer l'expression de la MSLN sur les cellules tumorales de la lignée HCC70 par Western Blot et IHC, et pu valider l'utilisation du nanobody A1 pour les études d'IHC.

Discussion

Le sous-type de cancer du sein triple négatif est associé à un pronostic péjoratif avec des métastases à distance, une récurrence précoce et une diminution de la survie globale par rapport aux autres formes de cancers du sein (Dent et al., 2007). Ces cancers du sein TN sont traités par chimiothérapie et/ou radiothérapie du fait de l'absence de thérapie ciblée actuellement disponible en routine clinique. De nombreuses cibles potentielles de ces tumeurs ont été identifiées parmi lesquelles **la mésothéline** (Andre and Zielinski, 2012 ; Crown, O'Shaughnessy, and Gullo, 2012). Cette glycoprotéine membranaire de 40 kDa possède la particularité d'être (1) très peu exprimée par les tissus sains, avec une expression restreinte au niveau de la plèvre, du péritoine et du péricarde, et (2) surexprimée dans des cancers très agressifs tels que les adénocarcinomes pancréatiques, les tumeurs ovariennes, mais également les cancers du sein et notamment par 25 à 67 % des cancers du sein TN (Tchou et al., 2012 ; Parinyanitikul et al., 2013 ; Bayoglu et al., 2015). Compte tenu de la très faible expression physiologique et de la surexpression de cette cible en cancérologie, de nombreuses thérapies ciblant la MSLN ont été développées et sont actuellement en cours de transfert clinique (Hassan et al., 2016). **Identifier les patients avec des tumeurs exprimant la MSLN permettrait de pouvoir sélectionner ceux pouvant bénéficier de ces thérapies prometteuses.** Si la méthode de référence reste la biopsie tumorale, qui permet d'avoir une information sur le phénotype de la lésion primaire, elle n'est pas applicable dans le cadre du cancer du sein métastatique. En effet, si la biopsie de la tumeur primaire est réalisée, les lésions à distance peuvent avoir un phénotype différent de la tumeur primaire et cette discordance a particulièrement été démontrée pour le cancer du sein (Lindström et al., 2012). Il est donc impossible de caractériser la totalité des lésions par cette méthode. Un phénotypage en imagerie serait donc très pertinent. Dans ce contexte, l'imagerie nucléaire est la seule technique d'imagerie moléculaire disponible en routine clinique. **L'objectif de la présente étude a été de réaliser l'imagerie phénotypique des tumeurs du sein**

exprimant la MSLN par imagerie nucléaire dans des modèles pré-cliniques de cancer du sein TN.

Deux ligands de la MSLN ont précédemment été sélectionnés et produits au sein du CRCM (Prantner et al., 2015). Il s'agit de deux nanobodies : A1 et C6. Les nanobodies sont des molécules particulièrement intéressantes pour l'imagerie puisqu'ils combinent haute affinité et spécificité avec un très faible poids moléculaire (15 kDa) permettant une pénétration tissulaire satisfaisante et une clairance sanguine rapide. Ceci conduit à l'obtention d'images avec un contraste intéressant à temps court, dès 1 h après l'injection.

Dans cette étude, les deux nanobodies ont été radiomarqués au ^{99m}Tc , pour l'imagerie TEMP. Ces nanobodies, ^{99m}Tc -A1 et ^{99m}Tc -C6 ont été évalués *in vitro* et *in vivo*. Deux lignées cellulaires de cancer du sein TN ont été sélectionnées, il s'agit des lignées HCC70 et MDA-MB-231. L'expression de la MSLN a été mesurée par WB. Les cellules HCC70 exprimaient la MSLN contrairement aux cellules MDA-MB-231. La forme à 40 kDa est l'unique forme protéique détectée par l'anticorps commercial. L'expression de la MSLN par les cellules HCC70 est en accord avec les résultats obtenus par Alewine et al. Cependant, dans cette étude les auteurs avaient également observés une faible expression de la MSLN par les cellules MDA-MB-231 (Alewine et al., 2014). Néanmoins, d'autres études ont conclu à une absence d'expression de la MSLN par la lignée MDA-MB-231 (Uehara, Matsuoka, and Tsubura, 2008). Dans notre étude, cette lignée a donc été utilisée comme contrôle négatif pour les différentes expérimentations.

Après radiomarquage, nous avons pu montrer *in vitro* que ^{99m}Tc -A1 possédait la meilleure affinité pour la MSLN, que ce soit sur la protéine recombinante ou sur les cellules HCC70 avec une affinité près de 3 fois supérieure à celle de ^{99m}Tc -C6. Ceci est en accord avec les études menées par Prantner et al. sur ces nanobodies non radiomarqués et permettent de montrer qu'après radiomarquage, ces deux nanobodies conservent la reconnaissance de leur cible (Prantner et al., 2015). Les expériences de compétition *in vitro* ont permis de démontrer la spécificité de liaison de ces deux nanobodies.

Le radiomarquage de ces nanobodies via la méthode tricarbonyle s'est avéré très stable, que ce soit dans le milieu de marquage, ou *in vitro* après incubation dans le sang humain et *in vivo* après injection aux souris, avec des PRC > 98 % à tous les temps étudiés. De plus, la plus grande partie de $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$ est retrouvé dans la fraction plasmatique, permettant une biodisponibilité importante.

Les études *in vivo* ont permis de démontrer le potentiel de $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$ à cibler les tumeurs HCC70. Les 2 nanobodies permettent la visualisation de ces tumeurs de manière non invasive et cela dès 1 heure après l'injection du traceur. Sur les images, il est possible de voir que $^{99m}\text{Tc-A1}$ et $^{99m}\text{Tc-C6}$ s'accumulent dans les tumeurs HCC70 positives pour la MSLN, alors qu'aucun signal n'est visible dans les tumeurs MDA-MB-231 négatives pour l'expression de cette cible. De plus, $^{99m}\text{Tc-A1}$ s'accumule de manière plus importante que $^{99m}\text{Tc-C6}$ dans les tumeurs HCC70. En effet, après quantification des images TEMP/TDM, nous avons pu montrer que $^{99m}\text{Tc-A1}$ se fixait 5 fois plus dans les tumeurs HCC70 que dans les tumeurs MDA-MB-231 et 1,5 fois plus que $^{99m}\text{Tc-C6}$ dans ces premières. Ces résultats vont dans le sens de ceux obtenus *in vitro* sur le meilleur potentiel de $^{99m}\text{Tc-A1}$ à cibler ces tumeurs. De plus, les études de compétition menées *in vivo* ont permis de démontrer la spécificité de la liaison de $^{99m}\text{Tc-A1}$ au sein des tumeurs exprimant la MSLN.

Une accumulation importante dans les reins a été observée avec les deux traceurs, en accord avec le profil de distribution classique des nanobodies (Tchouate Gainkam et al., 2011). En effet, le couple de protéines mégaline/cubuline situé dans le tubule contourné proximal, joue un rôle important dans la réabsorption des protéines de faible poids moléculaire ayant échappé au processus de filtration glomérulaire. Ce mécanisme est en grande partie responsable de la forte accumulation des nanobodies dans les reins. Ces deux protéines chargées négativement vont capter les protéines chargées positivement pour former un complexe ligand/récepteur qui sera internalisé dans des puits à clathrine et transféré dans les endosomes. En plus de la fixation tumorale, les études de compétition ont révélé une diminution de la fixation de $^{99m}\text{Tc-A1}$ dans les reins qui peut être expliquée par la saturation de ce complexe protéique par le compétiteur.

Différentes méthodes permettant d'atténuer la rétention rénale des nanobodies dans le cortex rénal ont été explorées, notamment en saturant les récepteurs du complexe mégaline/cubuline par l'injection d'une solution de gélofusine, un substitut du plasma (D'Huyvetter et al., 2014).

Aucun signal n'a été observé sur les images TEMP des souris injectées avec ^{99m}Tc -A1 à l'exception de la tumeur, du rein et de la vessie résultant principalement (1) de la très faible expression de la MSLN en conditions physiologiques (plèvre, péricarde et péritoine), mais aussi (2) par l'absence de cross-réactivité de ce nanobody pour la forme murine de la MSLN. De manière intéressante, contrairement au ^{99m}Tc -A1, ^{99m}Tc -C6 est visible dans le foie et les intestins, suggérant l'implication de la voie hépatique dans l'élimination de ce traceur.

^{99m}Tc -A1 possède des caractéristiques très favorables par rapport aux autres ligands de la MSLN décrits dans la littérature. En effet, des anticorps monoclonaux entiers et par conséquent de poids moléculaires élevés ont été radiomarqués au ^{89}Zr et au ^{64}Cu et évalués sur des modèles de xénogreffes de tumeurs du pancréas (Kobayashi et al., 2015 ; ter Weele et al., 2015). Cependant, l'élimination hépatique et la clairance sanguine de ces anticorps représentent des limitations majeures à leur utilisation dans le cadre d'une imagerie phénotypique de lésions secondaires. La plus petite taille des agents d'imagerie de type nanobody, permet une élimination rapide du sang et une acquisition d'images avec des rapports signal/bruit de fond élevés, dès une heure suivant l'injection du radiotraceur. Le rapport T/S (tumeur/sang) de ^{99m}Tc -A1 de 14, 2 h après l'injection, semble également très favorable en comparaison des rapports compris entre 1 et 4 observés 24 h après l'injection d'anticorps entiers marqués au ^{89}Zr et au ^{64}Cu (Kobayashi et al., 2015; ter Weele et al., 2015).

Etant donné que 20 % des femmes atteintes de cancer du sein vont développer des métastases à distance dans les 5 ans suivant le diagnostic, l'agent d'imagerie idéal doit présenter des hauts rapports signal/bruit de fond, non seulement au niveau du site primaire, mais aussi dans les lésions pulmonaires,

hépatiques, ou encore osseuses. Dans cette étude, nous pouvons noter des fixations minimales dans ces organes avec $^{99m}\text{Tc-A1}$, mais pas avec $^{99m}\text{Tc-C6}$.

En prenant en considération cette dernière caractéristique, ainsi que le fait que $^{99m}\text{Tc-A1}$ présente une meilleure affinité et une plus forte fixation tumorale que $^{99m}\text{Tc-C6}$, cette étude suggère que $^{99m}\text{Tc-A1}$ serait le meilleur candidat pour une imagerie des cancers du sein métastatiques.

Conclusion de l'étude

Identifier les métastases exprimant la MSLN permettrait donc de sélectionner les patients pouvant bénéficier des thérapies ciblant ces tumeurs. Les 2 nanobodies ont été évalués pour leur capacité à lier les tumeurs du sein TN exprimant cette protéine, sur des modèles murins de xénogreffes. Les résultats obtenus démontrent **le potentiel de $^{99m}\text{Tc-A1}$ pour l'imagerie de la MSLN**. A ce stade, ce radiotracer pourrait être utilisé comme marqueur compagnon des thérapies anti-MSLN en développement. Cela nécessiterait de produire cet agent aux normes de bonnes pratiques de fabrications (BPF). Cependant, la perspective envisagée consistera à faire de A1 un agent théranostique. Pour cela, les prochaines études viseront à modifier la séquence de ce nanobody, afin de réduire la fixation rénale, puis de le marquer avec le ^{68}Ga et ^{177}Lu , pour faire de A1 une molécule théranostique. Une fois le potentiel théranostique de cet agent validé, l'objectif sera de produire la molécule aux normes BPF en vue d'un futur transfert clinique.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication (Montemagno et al., 2018) et d'un dépôt de brevet (PCT/EP2018/073174)

Partie II : Imagerie phénotypique des tumeurs du sein exprimant VCAM-1

Partie II : Imagerie phénotypique des tumeurs du sein exprimant VCAM-1

La deuxième partie de ces travaux de thèse a été consacrée à l'imagerie phénotypique des tumeurs du sein exprimant **la protéine VCAM-1**. Il s'agit d'une molécule d'adhésion jouant un rôle crucial dans les processus inflammatoires à travers le recrutement des leucocytes. L'implication de VCAM-1 en cancérologie est connue depuis 30 ans. Son expression sur les cellules endothéliales est à l'origine de l'adhésion des cellules tumorales au niveau d'un site de dissémination métastatique. Plus récemment, une **expression de VCAM-1 sur les cellules tumorales** a également été rapportée, notamment dans le cancer du sein. Dans ce cancer, VCAM-1 semble jouer un **rôle primordial dans la dissémination métastatique pulmonaire mais aussi osseuse**, à travers son expression sur les cellules tumorales. Le développement d'un outil dédié à l'imagerie phénotypique de VCAM-1 pourrait avoir un intérêt pré-clinique, en particulier pour affiner le rôle de VCAM-1 dans ces phénomènes. De plus, si l'expression de VCAM-1 est étroitement liée à la dissémination métastatique, sa valeur pronostique n'a jamais été évaluée dans la maladie métastatique. Disposer d'un tel agent permettrait d'évaluer celle-ci en pratique clinique.

1. Vascular Cell Adhesion Molecule-1

1.1 Identification et découverte de VCAM-1

La protéine VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), ou CD106, a été découverte simultanément par deux équipes de recherche indépendantes en 1989 (Rice, 1989 ; Osborn et al., 1989). Rice l'a décrit comme une glycoprotéine transmembranaire de 110 kDa, capable de lier les cellules cancéreuses de mélanome et l'ont dénommé INCAM-110 (Inducible Cell Adhesion Molecule) (Rice, 1989). En 1990, la même équipe a montré que les lymphocytes et monocytes sanguins adhèrent à INCAM-110 (Rice, 1990). Parallèlement, l'équipe de Osborn et al. a cloné une molécule de la famille des immunoglobulines exprimée par l'endothélium activé par le TNF- α ou l'IL-1 (Osborn et al., 1989). Cette protéine a été appelée VCAM-1. Il a finalement été démontré que INCAM-110 et VCAM-1 étaient une seule et même molécule (Taichman et al., 1991).

1.2 Structure de VCAM-1

VCAM-1 appartient à la superfamille des immunoglobulines (Ig), comprenant plusieurs domaines Ig-like, une région transmembranaire et un domaine cytoplasmique de 19 acides aminés (Cook-Mills, Marchese, and Abdala-Valencia, 2011). Deux variants issus d'épissage alternatif de VCAM-1 ont été identifiés chez l'homme et chez la souris (figure 98). Il existe ainsi chez l'homme, une protéine avec 7 domaines Ig-like et une avec 6, le domaine 4 étant absent chez cette dernière. Il existe des homologies de séquences entre les domaines 1 et 4, 2 et 5, 3 et 6 (Cook-Mills, Marchese, and Abdala-Valencia, 2011).

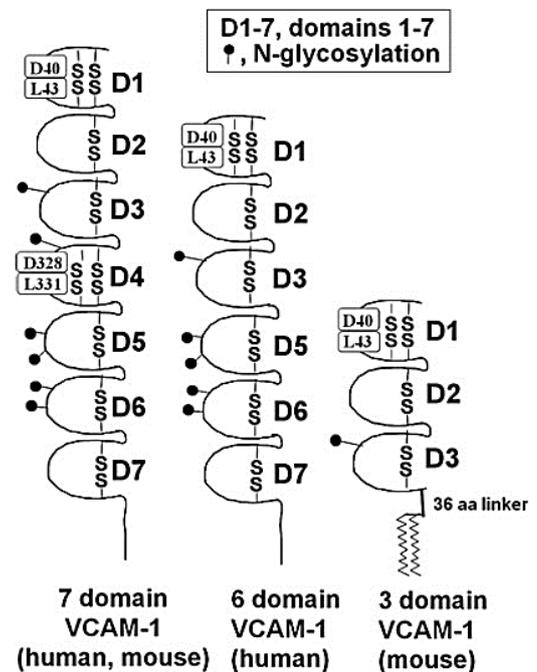


Figure 98. Variants d'épissage alternatif de la protéine VCAM-1 humaine et murine. (Cook-Mills et al., 2010).

Le domaine cytoplasmique de 19 AA est connecté au cytosquelette d'actine via les protéines Ezrin et Moesin (Barreiro et al., 2002). Une forme soluble de la protéine VCAM-1 a également été découverte. Elle résulte du clivage par une protéine de la famille des métalloprotéases, ADAM17, et dans une moindre mesure par ADAM8 et ADAM9 (Garton et al., 2003 ; Matsuno et al., 2006 ; Guaiquil et al., 2009).

1.3 Rôle de VCAM-1 en physiologie

VCAM-1 joue un rôle majeur en physiologie, que ce soit dans l'embryogenèse puisqu'une délétion de cette protéine chez la souris est létale au stade embryonnaire, ou dans la fonction du système immunitaire (Gurtner et al., 1995; Cook-Mills, Marchese, and Abdala-Valencia, 2011).

➤ Types cellulaires exprimant VCAM-1

VCAM-1 est majoritairement exprimée par les cellules endothéliales après stimulation par des facteurs pro-inflammatoires. En plus de son expression induite par l'inflammation, VCAM-1 peut également être exprimée constitutivement par de nombreux types cellulaires. En effet, les cellules stromales (cellules endothéliales, fibroblastes), qui constituent l'environnement médullaire des organes lymphoïdes primaires (thymus, moëlle osseuse) et secondaires (ganglions, rate) sont impliqués dans la différenciation des lymphocytes B qui implique la liaison VCAM-1/VLA-4 (Very-Late Antigen 4) (Cook-Mills, Marchese, and Abdala-Valencia, 2011). D'autres types cellulaires, comme les cellules dendritiques folliculaires, les macrophages de la rate et du thymus expriment VCAM-1 en conditions physiologiques (Rice. 1990).

➤ Interaction VCAM-1/VLA-4

VLA-4 ou l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ est le principal ligand de VCAM-1. Tous les variants de VCAM-1 peuvent lier l'intégrine $\alpha 4\beta 1$, mais peuvent également se fixer sur $\alpha 4\beta 7$ et $\alpha 8\beta 2$ (Cook-Mills, Marchese, and Abdala-Valencia, 2011). VLA-4 est exprimée par différentes cellules immunitaires : les polynucléaires éosinophiles, basophiles, les natural killers, les monocytes, ou encore les lymphocytes B et T. L'interaction entre $\alpha 4\beta 1$ et VCAM-1 joue un rôle crucial dans l'arrimage de ces

leucocytes à l'endothélium. Les domaines 1 ou 4 de VCAM-1 constituent les domaines nécessaires et suffisants à l'interaction avec son ligand VLA-4.

➤ [Adhésion des leucocytes](#)

De par son expression sur les cellules endothéliales, VCAM-1 est à l'origine de l'adhésion des cellules immunitaires exprimant son ligand à l'endothélium vasculaire. Alors qu'elle est faiblement exprimée en dehors de toute stimulation par les cellules endothéliales, l'expression de VCAM-1 est fortement induite en conditions inflammatoires, par une multitude de cytokines, des espèces radicalaires de l'oxygène (ROS), ou encore des agonistes des « Toll-like receptors » (TLR) (Lee et al., 2001 ; Hortelano et al., 2010). VCAM-1 est ainsi un acteur majeur de la réponse inflammatoire en recrutant les leucocytes exprimant VLA-4 sur les sites inflammatoires.

➤ [Diapédèse des leucocytes](#)

En plus de son rôle dans l'adhésion des leucocytes sur les cellules endothéliales, VCAM-1 est impliqué dans les voies de signalisation qui régulent leur passage à travers la barrière endothéliale (figure 99) (Vestweber, 2015). La partie intracellulaire de VCAM-1 interagit avec Ezrin, une des protéines de la famille ERM (Ezrin/Radixine/Moesine). Ces protéines cytoplasmiques jouent le rôle d'adaptateurs, faisant le lien entre des protéines transmembranaires et le cytosquelette d'actine (Fehon, McClatchey, and Bretscher, 2010). Par l'intermédiaire de ce réseau protéique, VCAM-1 induit un remodelage du cytosquelette d'actine. De plus, l'activation de VCAM-1, via son interaction avec VLA-4, est à l'origine d'une activation de Rac1, une Rho-GTPase, avec comme conséquence un remodelage des jonctions entre les cellules endothéliales (van Wetering et al., 2003). Un rôle similaire de VCAM-1 a également été décrit dans l'extravasation des cellules tumorales (Cardones, Murakami, and Hwang, 2003 ; Taichman et al., 1991). Une autre conséquence de la signalisation impliquant VCAM-1 est l'activation de la NADPH oxydase (NOX2), qui génère la production de faibles concentrations d'espèces radicalaires de l'oxygène. Celles-ci oxydent les métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 qui digèrent alors les composants de la MEC,

facilitant ainsi la transmigration des leucocytes (Matheny, Deem, and Cook-Mills, 2000 ; Deem, 2004).

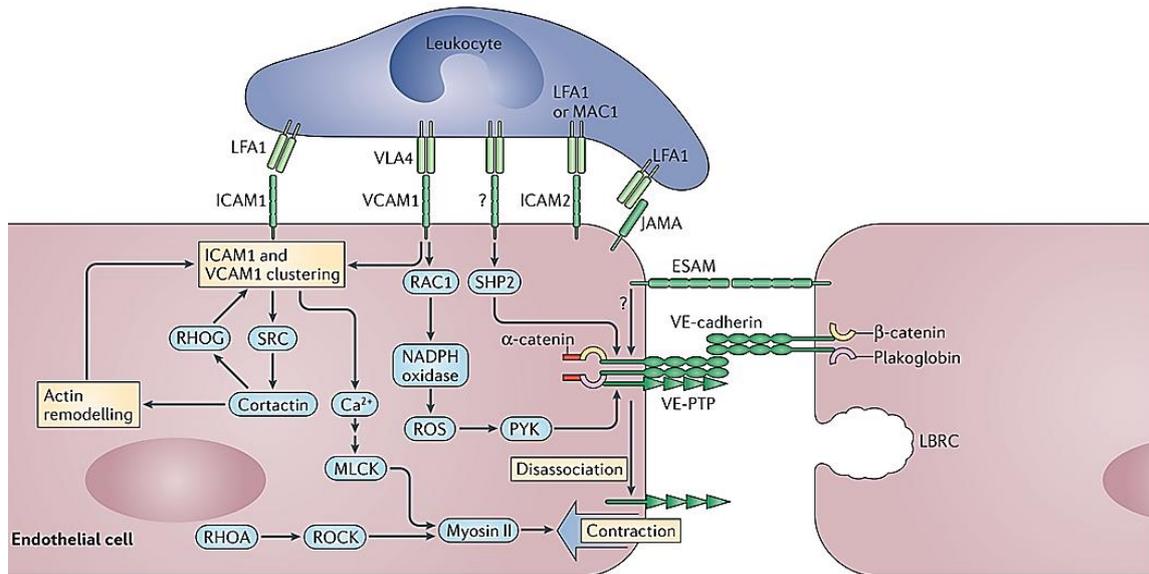


Figure 99. Initiation de la transmigration des leucocytes au travers de la barrière endothéliale. La signalisation VCAM-1 joue un rôle clé dans la transmigration des leucocytes, notamment à travers le remodelage du cytosquelette d'actine et celui des cadhérines. (Vestweber, 2015).

➤ Rôle de VCAM-1 dans les organes lymphoïdes

Comme nous l'avons évoqué précédemment, d'autres types cellulaires que les cellules endothéliales peuvent exprimer VCAM-1 et notamment les cellules du stroma de la moelle osseuse, des ganglions ou encore de la rate. L'expression de VCAM-1 dans la moelle osseuse joue un rôle crucial dans le « homing » des lymphocytes B (Ren et al., 2010). Dans les ganglions, l'expression de VCAM-1 par les cellules dendritiques induit la maturation des lymphocytes B. Dans la rate, il a récemment été montré que VCAM-1 est essentielle à l'hématopoïèse extra-médullaire (Dutta et al., 2015).

1.4 Rôle de VCAM-1 dans les pathologies inflammatoires

Du fait de son implication dans les processus inflammatoires et notamment dans le recrutement des leucocytes vers les cellules endothéliales, une surexpression de VCAM-1 est retrouvée dans plusieurs pathologies

inflammatoires comme les maladies auto-immunes ou l'athérosclérose (Allavena et al., 2010 ; Cybulsky et al., 2001).

➤ [Les pathologies auto-immunes](#)

On retrouve une expression de VCAM-1 dans plusieurs pathologies auto-immunes, notamment dans la maladie de Crohn et la sclérose en plaques (SEP). VCAM-1 joue un rôle prépondérant dans la transmigration des leucocytes dans ces pathologies, si bien que l'interaction VCAM-1/VLA-4 est devenue une cible de leur traitement (Yusuf-Makagiansar et al., 2002).

➤ [L'athérosclérose](#)

L'OMS définit l'athérosclérose comme « une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyens calibres consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires ; le tout s'accompagnant de modifications de la média ». Cette accumulation forme des plaques d'athérome. Des facteurs génétiques mais aussi environnementaux (alimentation, sédentarité, hypercholestérolémies...) favorisent leur développement. La majorité de ces plaques sont non sténosantes c'est-à-dire qu'elles n'entraînent pas de rétrécissement de la lumière du vaisseau (Fuster et al., 2005). Ces plaques peuvent rompre entraînant une mise en contact des facteurs pro-thrombotiques de la plaque avec la circulation sanguine, causant un thrombus. Ce thrombus est à l'origine de l'infarctus du myocarde et des accidents vasculaires cérébraux. Ces plaques sont non symptomatiques jusqu'à leur rupture et sont indétectables en routine clinique.

Au cours du développement de la plaque, l'apparition de phénomènes inflammatoires liés à l'infiltration de monocytes circulants constitue un point crucial. Ils sont impliqués dans l'évolution vers un phénotype vulnérable (Libby, Ridker, and Hansson, 2011). Les protéines d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1) sont responsables de l'infiltration des monocytes au sein de la plaque. Ces dernières se différencient en macrophages et phagocytent les lipoprotéines présentes dans l'intima, devenant des cellules spumeuses. Ces cellules spumeuses produisent des

cytokines inflammatoires, des espèces radicalaires de l'oxygène (ROS) et des métalloprotéases. Ainsi, l'accumulation de cellules spumeuses combinée à une intense réponse inflammatoire est à l'origine de l'instabilité de la plaque en formant un cœur lipidique et nécrotique instable (figure 100).

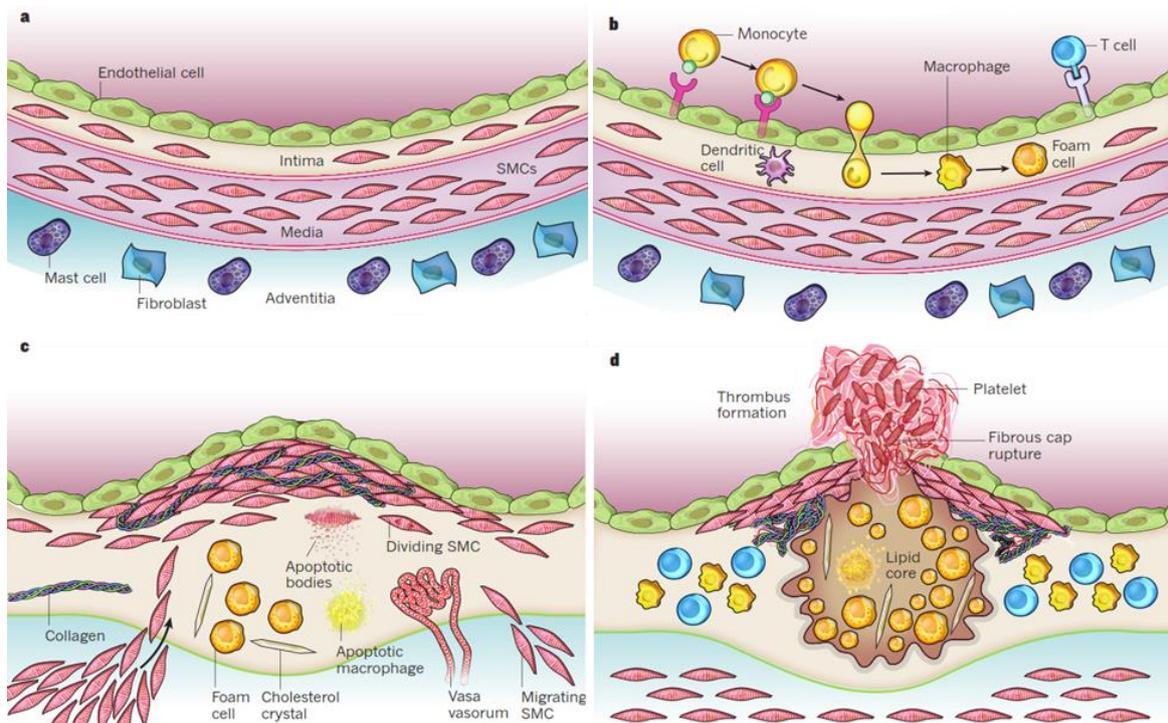


Figure 100. Formation et rupture de la plaque d'athérome vulnérable. (a) Paroi artérielle saine. (b) Adhésion de leucocytes circulants à l'endothélium vasculaire, puis migration dans l'intima. (c) Progression de la plaque avec migration des cellules musculaires lisses (CML) de la média vers l'intima, entraînant un changement phénotypique de ces cellules. Les CML et les macrophages entrent en apoptose conduisant à la formation de corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques s'accumulent dans la plaque et forme un corps lipidique et nécrotique. (d) Rupture de la chape fibreuse et mise en contact des facteurs prothrombogènes avec la circulation sanguine pouvant provoquer un thrombus. (Libby P et al., 2011).

2. VCAM-1 et progression tumorale

2.1 Expression sur les cellules endothéliales vasculaires

Déjà à la fin des années 1980, l'implication des molécules d'adhésion de l'endothélium en cancérologie, et notamment dans la dissémination métastatique, avait été démontrée (Rice, Gimbrone, and Bevilacqua, 1988). De nombreuses études *in vitro* ont dans un premier temps permis de démontrer le rôle crucial de VCAM-1 endothéliale dans l'adhésion de différentes cellules tumorales (mélanome, rein, leucémie) exprimant VLA-4 (Taichman et al., 1991 ; Schlesinger and Bendas, 2015). Le pré-traitement des cellules endothéliales avec du TNF- α ou de l'IL-1 entraîne une augmentation de l'expression de VCAM-1 et une adhésion accrue des cellules du mélanome VLA-4+ (Schlesinger and Bendas, 2015). Les études menées *in vivo* ont confirmé cette observation (Okahara et al., 1994 ; Cardones, Murakami and Hwang, 2003). Ainsi, dans un modèle expérimental de métastases pulmonaires, le traitement préalable de souris avec du TNF- α ou de l'interleukine IL-1 β entraîne une augmentation du nombre de nodules métastatiques dans ce tissu (Okahara et al., 1994). Le traitement par des anticorps anti-VCAM-1 ou anti-VLA-4 réduit significativement cette colonisation, démontrant l'implication de cette interaction dans ces phénomènes. Plus récemment, un tel rôle de VCAM-1 a été décrit dans la colonisation du tissu cérébral (Soto et al., 2014). **Ces études ont ainsi permis d'identifier VCAM-1 comme un acteur clé de l'adhésion des cellules tumorales à l'endothélium.**

Il est intéressant de noter que VCAM-1 est non seulement impliquée dans l'adhésion à l'endothélium des cellules tumorales exprimant VLA-4, mais aussi dans leur transmigration (Klemke et al., 2007). Quels sont les mécanismes à l'origine de l'expression de VCAM-1 ? Comme nous l'avons vu, les cellules tumorales, une fois dans la circulation sanguine vont interagir avec des plaquettes qui les protègent vis-à-vis d'une élimination par le système immunitaire. Ces plaquettes sécrètent des cytokines pro-inflammatoires responsables de l'activation de l'endothélium, et donc de l'expression de VCAM-1, mais aussi du recrutement de cellules immunitaires (neutrophiles, monocytes)

(figure 101) (Gay and Felding-Habermann, 2011). Ces interactions jouent des rôles prépondérants dans la dissémination métastatique. De tels mécanismes d'interaction entre cellules tumorales et cellules immunitaires ont notamment été décrits dans le tissu hépatique. L'interaction entre les cellules de Kupffer du foie (macrophages) et les cellules tumorales conduit à une sécrétion de TNF- α . Celle-ci entraîne la surexpression de VCAM-1 sur les cellules endothéliales, facilitant alors la création d'une niche métastatique dans ce tissu (Khatib et al., 2005). Dans ces phénomènes, il a plus récemment été montré que VCAM-1, tout comme VAP-1 (Vascular Adhesion Protein-1), permet le recrutement et la rétention de cellules myéloïdes au sein du foyer métastatique, nécessaires à la colonisation des cellules tumorales à distance (Ferjancic et al., 2013).

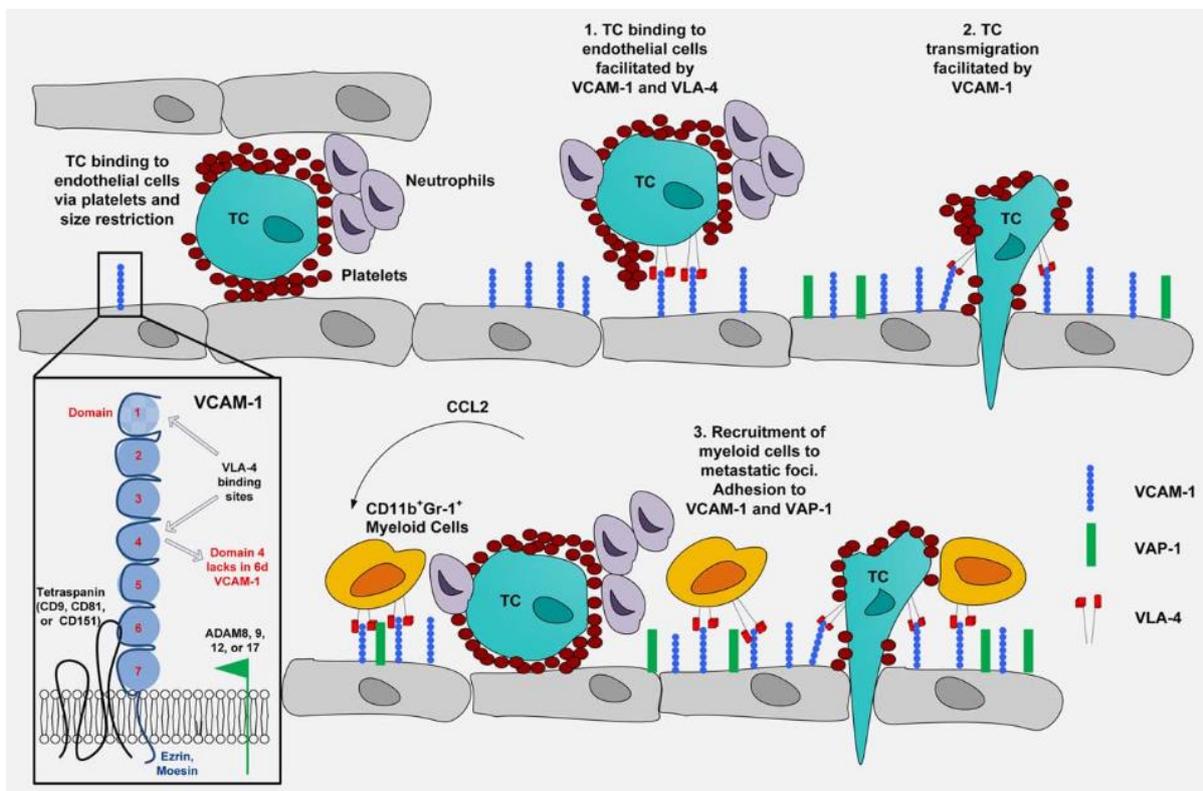


Figure 101. Contribution de VCAM-1 dans la dissémination métastatique via son expression sur les cellules endothéliales. Les cellules tumorales présentes dans la circulation sanguine sont entourées de plaquettes et cet agrégat va s'arrêter à proximité des cellules endothéliales et les activer. Les cellules tumorales exprimant VLA-4 (1) adhèrent à l'endothélium via une interaction avec VCAM-1, puis (2) transmigrent à travers cette paroi. (3) Les cellules tumorales peuvent interagir avec des cellules myéloïdes ce qui contribue à la création d'une nouvelle niche métastatique (Schlesinger et al., 2015).

✓ Angiogenèse

Au cours de la création de nouveaux vaisseaux sanguins, les cellules endothéliales expriment de faibles niveaux de VCAM-1. Dans des modèles de souris porteuses ou non de métastases pulmonaires issues de mélanome, l'équipe de Piali a quantifié le nombre de vaisseaux sanguins drainant les tumeurs positifs pour VCAM-1 (figure 102) (Piali et al., 1995). Cette équipe a pu montrer que la présence de métastases dans le poumon était associée à une baisse significative de l'expression de VCAM-1. Cette diminution de l'expression de VCAM-1 aurait pour conséquence de protéger la tumeur vis-à-vis d'une réponse immunitaire anti-tumorale (Griffioen et al., 1996).

La sécrétion de VEGF et de bFGF par les cellules tumorales pourrait être à l'origine de la baisse de l'expression de VCAM-1 (Dirkx, Heijnen, and Boumater, 2003). Toutefois, même si l'expression de VCAM-1 semble diminuée dans les néo-vaisseaux drainant les tumeurs, il a cependant été rapporté un rôle pro-angiogénique de sa forme soluble (sVCAM-1) (Byrne J et al., 2000).

Experiment No.	Normal lung			Metastasis		
	1	2	3	1	2	3
VCAM-1	269/285 94%	183/189 97%	237/253 94%	34/202 17%	15/96 16%	32/160 20%

Figure 102. Répression de l'expression de VCAM-1 sur l'endothélium tumoral dans un modèle murin de mélanome métastatique. Le nombre de vaisseaux exprimant VCAM-1 a été quantifié chez des souris saines (à gauche) ou porteuses de métastases issues de mélanome (à droite). Trois expériences ont été réalisées (1 à 3) (Piali et al., 1995).

2.2 Expression sur les cellules endothéliales lymphatiques

La colonisation lymphatique et l'atteinte des ganglions par les cellules tumorales marquent l'une des premières phases de la dissémination métastatique. L'interaction VCAM-1/VLA-4 semble être au cœur de la colonisation lymphatique par les cellules tumorales. Une expression constitutive de VCAM-1 a été identifiée sur les cellules lymphatiques endothéliales, et l'adhésion de cellules tumorales de mélanome (B16) exprimant VLA-4 est dépendante de celle-ci (Rebhun et al., 2010).

Cette équipe a également validé *in vivo* le rôle primordial de l'interaction VCAM-1/VLA-4 dans la colonisation ganglionnaire. En effet, la délétion du domaine $\alpha 4$ de VLA-4 sur ces cellules abolit leur capacité à envahir les ganglions. L'atteinte ganglionnaire étant un processus clé de l'évolution tumorale, d'autres études sont nécessaires afin de déterminer la valeur pronostique de la co-détection VCAM-1/VLA-4.

2.3 Expression sur les cellules tumorales

Les analyses transcriptomiques de tumeurs primaires du sein ont permis l'identification de gènes dont la présence est susceptible d'influer sur le pronostic des patientes (van de Vijver et al., 2002; Ramaswamy et al., 2002). Parmi eux, l'expression de VCAM-1 a été montrée comme jouant un rôle dans les processus métastatiques. Via son expression sur les cellules tumorales, cette protéine semble être impliquée dans différentes étapes de la dissémination métastatique : la lymphangiogenèse, la colonisation pulmonaire et osseuse.

✓ Lymphangiogenèse

Comme développé dans la partie précédente, l'interaction entre VCAM-1, exprimée par les cellules lymphatiques endothéliales, et VLA-4, exprimée par les cellules tumorales est une étape clé de la colonisation ganglionnaire, à travers la création d'un réseau lymphatique (lymphangiogenèse). Il a plus récemment été montré que les facteurs pro-lymphogéniques (VEGF-C, VEGF-A) sécrétés par la tumeur entraînent une activation de VLA-4 sur les cellules endothéliales lymphatiques. Ceci est à l'origine de la dissémination métastatique des cellules tumorales exprimant VCAM-1 dans les ganglions. Le blocage de l'interaction entre ces 2 partenaires réduit significativement la formation de métastases ganglionnaires soulignant le rôle pro-métastatique de cette interaction (Garmy-Susini et al., 2013).

✓ Colonisation pulmonaire

Les analyses transcriptomiques ont conduit à la découverte d'un rôle majeur de VCAM-1 dans la colonisation métastatique pulmonaire, classant VCAM-1 dans la catégorie des gènes dits « à signature métastatique pulmonaire » (Minn et al.,

2005). Le rôle de VCAM-1 dans ce processus a récemment été affiné par Chen et al. Ils ont pu montrer dans un modèle de métastases pulmonaires que la délétion de VCAM-1 dans des cellules tumorales du sein, MDA231-LM2, diminuait la colonisation pulmonaire d'environ 70 % (Chen, Zhang, and Massagué, 2011). Ces travaux ont permis de montrer que dans ces processus VCAM-1 n'a pas d'effet sur les phénomènes d'intravasation ou d'extravasation des cellules tumorales, mais leur fournit un signal de survie via une interaction avec les leucocytes du parenchyme pulmonaire. De manière similaire à sa fonction d'adhésion sur les cellules endothéliales, VCAM-1 interagit avec les leucocytes, majoritairement des macrophages exprimant VLA-4. L'interaction VCAM-1/VLA-4 entraîne une survie des cellules tumorales via une signalisation intracellulaire faisant intervenir Ezrin. Cette protéine est recrutée et activée par le domaine cytoplasmique de VCAM-1 et va activer la voie PI3K/Akt, médiateur de la survie cellulaire (figure 103). De plus, de hauts niveaux d'expression de VCAM-1 ont été rapportés dans des biopsies humaines de métastases pulmonaires, sans qu'il y ait de corrélation avec l'expression du marqueur CD31 (cellules endothéliales). Ce résultat suggère que cette expression provient des cellules tumorales (Chen, Zhang, and Massagué, 2011).

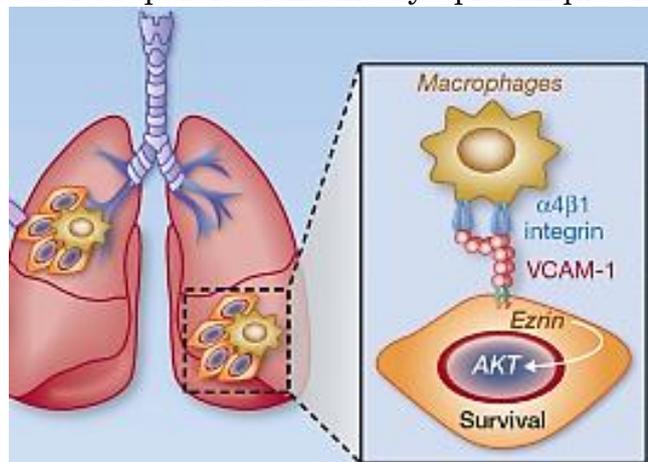


Figure 103. VCAM-1 et métastases pulmonaires.

Les cellules tumorales tirent profit de l'interaction avec les macrophages (TAMs) pour survivre dans le parenchyme pulmonaire. (Chen Q et Massagué J. 2012).

Les auteurs ont par ailleurs montré sur la base de 67 tissus métastatiques du sein, une association entre le contenu en leucocytes et les niveaux d'expression de VCAM-1. Ce résultat soutient l'hypothèse d'une interaction juxtacrine entre les cellules tumorales et les leucocytes.

✓ Colonisation osseuse

Si Chen et al. n'ont pas montré de lien direct entre l'expression de VCAM-1 par les cellules tumorales du sein et la colonisation osseuse, il semblerait que VCAM-1 joue un rôle prépondérant dans la sortie de dormance des métastases osseuses, et donc dans l'évolution d'une maladie micro-métastatique vers une maladie macro-métastatique (Lu et al., 2011). Dans l'os, la formation de macro-métastases nécessite la présence d'ostéoclastes, qui sécrètent des facteurs de croissance, et notamment du TGF- β , stimulant les cellules tumorales. Les cellules tumorales stimulent à leur tour les ostéoclastes. On parle de « cercle vicieux » (figure 104). Les travaux de Lu et al. ont permis de montrer que les progéniteurs ostéoclastiques exprimant VLA-4 sont recrutés par les cellules tumorales VCAM-1+, permettant leur différenciation en ostéoclastes matures, fonctionnels. C'est à travers ce mécanisme que la transition de micro- vers macro-métastases est en partie effectuée dans l'os. L'inhibition de l'interaction entre VCAM-1 et VLA-4 abolit celle-ci. Ils ont par ailleurs montré sur des biopsies de cancer du sein provenant de 170 patientes que de hauts niveaux de VCAM-1 dans la tumeur primaire du sein étaient associés à une rechute osseuse précoce. Tous les mécanismes à l'origine de l'expression de VCAM-1 ne sont pas encore élucidés.

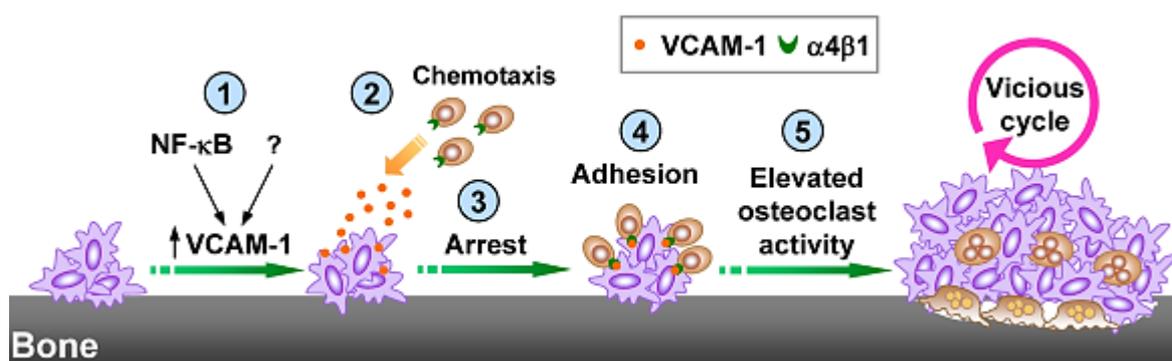


Figure 104. Modèle schématique de la transition micro- à macro-métastases dans l'os. L'expression et la sécrétion de VCAM-1 par des micro-métastases attirent des progéniteurs ostéoclastiques (pré-ostéoclastes) par chimiotactisme et adhésion. Ce phénomène est à l'origine d'une activation ostéoclastique permettant la dégradation de la matrice osseuse et la transition vers des macro-métastases. (Lu et al., 2011).

Ainsi VCAM-1, à travers son expression sur les cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques et sur les cellules tumorales semble jouer un rôle prépondérant dans la progression tumorale et la dissémination métastatique. Un faisceau d'évidences relie donc VCAM-1 aux phénomènes de dissémination métastatique.

➤ Expression sur les cellules tumorales et échappement tumoral

Au cours de son développement, la tumeur met en place des mécanismes d'échappement qui lui permettent de croître à l'insu du système immunitaire (Calmels. 2004). Les différents travaux de recherche menés dans ce domaine ont conduit à l'identification d'un mécanisme VCAM-1-dépendant. Les travaux de Lin et son équipe ont conduit à la génération d'un modèle de tumeurs résistantes aux immunothérapies anti-tumorales (Wu, 2007; Lin et al., 2007). Des analyses génomiques ont permis la mise en évidence d'une surexpression de VCAM-1 dans ces tumeurs. De plus, la transfection de VCAM-1 dans des tumeurs sensibles aux immunothérapies augmente leur résistance vis-à-vis de ces traitements. Ces données renforcent l'hypothèse de l'implication de VCAM-1 dans l'échappement tumoral à ces thérapies. Ces auteurs ont proposé le modèle suivant : l'expression de VCAM-1 permet l'interaction des cellules tumorales avec les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques exprimant VLA-4. Cette interaction conduit à une migration des cellules T CD8⁺ hors de la tumeur, et donc à une diminution significative du nombre de lymphocytes T-CD8⁺ intra-tumoraux. Les mécanismes moléculaires précis de l'échappement tumoral induit par VCAM-1 ne sont néanmoins pas encore décryptés. Plusieurs études ont montré que l'interaction VCAM-1/VLA-4 est à l'origine de la migration des LT CD8⁺. En effet, cette interaction permet la phosphorylation de la paxilline, protéine adaptatrice, qui peut alors activer les protéines FAK (Focal Adhesion Kinase), impliquées dans la régulation des adhésions focales et de la migration cellulaire (Liu et al., 1999). Ces données soutiennent l'hypothèse de la médiation de l'échappement tumoral par VCAM-1. De plus, si l'on empêche cette interaction par des mutations introduites dans la séquence de VLA-4, on observe une augmentation du nombre de lymphocytes T-CD8⁺ dans la tumeur. Ces résultats suggèrent un rôle important de VCAM-1 dans

l'échappement tumoral vis-à-vis de la vigilance du système immunitaire (figure 105).

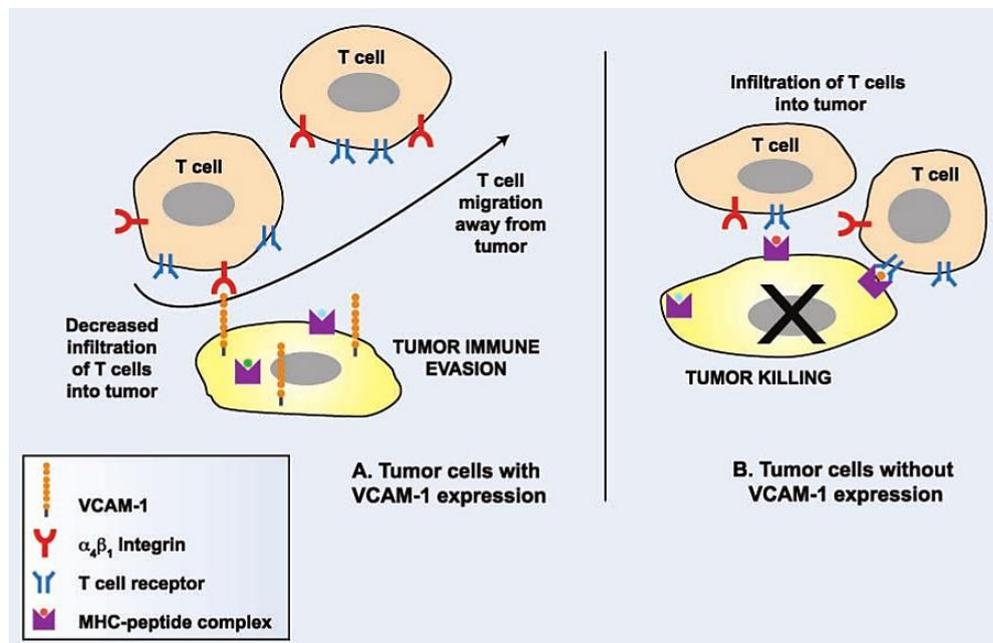


Figure 105. Rôle de VCAM-1 dans l'échappement tumoral : modèle proposé. A) Les tumeurs exprimant VCAM-1 interagissent avec les lymphocytes T exprimant VLA-4. Cette interaction conduit à une migration de ces derniers depuis la tumeur, à l'origine d'un échappement tumoral. B) Dans le cas de tumeurs n'exprimant pas VCAM-1, il n'y a pas d'interaction avec VLA-4. Les cellules tumorales présentent alors un antigène à la surface des CMHI activant les LT et conduisant à une infiltration accrue des cellules T dans la tumeur (Wu, 2007).

Les multiples fonctions de VCAM-1 dans la progression tumorale sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Localisation	Expression	Conséquences fonctionnelles	Effets sur la progression tumorale
Cellules endothéliales vasculaires	Augmentée	-Adhésion et transmigration des cellules tumorales - Recrutement de cellules myéloïdes	Pro-tumoral à travers la création d'une niche métastatique
Vaisseaux angiogéniques	Diminuée	Diminution de l'infiltration des leucocytes	Protection contre le système immunitaire
Cellules tumorales	Augmentée	-Recrutement des macrophages et des pré-ostéoclastes -Diminution du nombre de LT CD8 + intra-tumoraux	-Signaux de survie et sortie de dormance métastatique -Echappement tumoral
Cellules endothéliales lymphatiques	Constitutive	Adhésion des cellules tumorales exprimant VLA-4	Métastases dans les ganglions

Tableau 14. Résumé des différentes expressions et rôles de VCAM-1 dans la progression tumorale.
(D'après Schlesinger et al., 2015).

3. Expression de VCAM-1 en cancérologie et valeur pronostique

Une expression de VCAM-1 a été rapportée dans plusieurs sous-types tumoraux et notamment dans les tumeurs du sein, gastriques, rénales, ovariennes ou encore dans les cancers colorectaux (Sharma et al., 2017; Banks et al., 1993).

➤ Tumeur gastrique

Une expression de VCAM-1 a été rapportée chez 75 % des patients atteints de cancers de l'estomac (n=41) (Ding et al., 2003). Elle a été mise en évidence par immunohistochimie, à la fois sur les cellules tumorales et sur les vaisseaux sanguins. De même, l'expression de VCAM-1 a été rapportée chez 92,9 % (n=22/26) des patients avec des métastases ganglionnaires en comparaison de 34,5 % chez des patients sans métastases (n=5/13). Les niveaux sériques de VCAM-1 (sVCAM-1) ont également été évalués et

ils sont fortement associés au stade tumoral (figure 106). Cependant, la valeur pronostique de sVCAM-1 dans ces cancers reste encore à démontrer. La co-détection de sVCAM-1 et sICAM-1 est en revanche associée à un mauvais pronostic (Nae Choon Yoo et al., 1998).

	<i>n</i>	Soluble VCAM-1(µg/ml) (<i>x</i> ± <i>s</i>)
Gastric cancer	41	878±46 ^a
I-II	17	764±24 ^b
III-IV	24	1006±78 ^c
Ulcer	8	301±21
Control	25	297±35

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.05, ^c*P*<0.05, (*vs* control group).

Figure 106. Niveaux de sVCAM-1 et stade du cancer gastrique. (Ding et al., 2003).

➤ Tumeur du rein

Chez des patients atteints d'un cancer du rein à cellules claires, le type le plus fréquent des cancers du rein, une surexpression de VCAM-1 a été rapportée chez 79 % des patients (n=338/429) et VCAM-1 apparait comme un marqueur de bon pronostic (Shioi et al., 2006).

➤ [Cancer de l'ovaire](#)

VCAM-1 a également été rapportée comme jouant un rôle important dans la progression tumorale dans le cancer de l'ovaire, et son expression est associée à un mauvais pronostic chez les patientes (Huang et al., 2013).

➤ [Cancer colorectal](#)

L'expression de VCAM-1 a été rapportée dans 57 % de cancers colorectaux (Maurer et al., 1998). Ces données ont été confirmées par le dosage de sVCAM-1 dans le sang de patients (Velikova et al., 1998). Il existe une association entre les niveaux sériques de VCAM-1 et le stade tumoral, et par conséquent une association de sVCAM-1 avec une survie diminuée (Alexiou et al., 2001). VCAM-1 a donc été proposée comme un marqueur pronostique du cancer colorectal.

➤ [Cancer du sein](#)

Etant donné le rôle pro-métastatique de VCAM-1 dans le cancer du sein, la valeur pronostique de son expression a été évaluée. Comme décrit dans la partie 2.3, de hauts niveaux d'expression de VCAM-1 ont été retrouvés dans les métastases pulmonaires de patientes atteintes d'un cancer du sein (Chen, Zhang, and Massagué, 2011). De plus, l'expression de VCAM-1 est associée à une rechute précoce (Lu et al., 2011). Récemment, les niveaux sériques de VCAM-1 chez 96 patientes avec un cancer du sein métastatique ou non, sans distinction de sous-type, ont été déterminés et n'ont pas montré d'élévation de sVCAM-1 par rapport aux sujets sains. Ce marqueur n'a aucune valeur pronostique (Karabulut et al.,

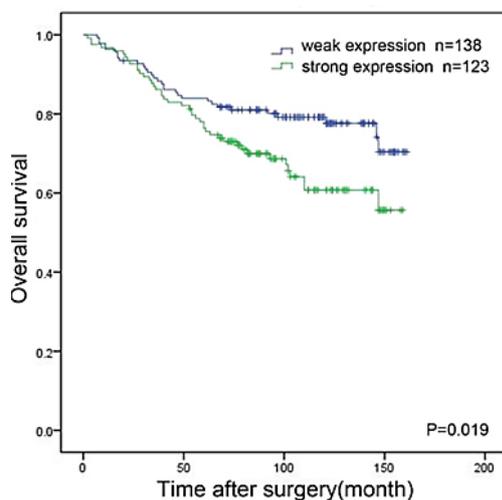


Figure 107. Survie des patients avec un cancer du sein exprimant de faibles ou de hauts niveaux de VCAM-1. L'expression de VCAM-1 a été classé en « High » ou « Low » en tenant compte du nombre de cellules exprimant VCAM-1 et de l'intensité de marquage (Maimaiti et al., 2016).

2014). Toutefois, ces données sont en contradiction avec celles de Silva et al. qui ont observé des niveaux plus élevés de sVCAM-1 chez des patientes avec un cancer du sein métastatique (n=13) par rapport aux patientes sans métastase à distance (n=40) (Silva et al., 2006). D'autres études sont donc nécessaires afin de conclure quant au rôle pronostique de sVCAM-1 étant donné (i) le faible nombre de patients des études, et (ii) l'absence de distinction entre les sous-types de cancer du sein. Il serait intéressant d'analyser la valeur pronostique de VCAM-1 dans les cancers du sein TN ou HER2, cancers à hauts potentiels métastatiques.

Maimaiti et al. ont récemment évalué en immunohistochimie l'expression de VCAM-1 sur 261 échantillons de cancer du sein traités chirurgicalement. Ils ont pu mettre en évidence une forte expression de VCAM-1, en considérant l'intensité de marquage et le nombre de cellules exprimant VCAM-1, chez 47,1 % des patients. Cette expression constitue un facteur de mauvais pronostic, avec une survie diminuée chez ces patientes (figure 107) (Maimaiti et al., 2016).

4. Ciblage thérapeutique de l'interaction VCAM-1/VLA-4

Etant donné le rôle pro-métastatique de VCAM-1, cette protéine a tout récemment été suggérée comme étant une cible intéressante pour une prise en charge thérapeutique en cancérologie (Sharma et al., 2017). L'interaction VCAM-1/VLA-4 est également la cible de thérapies pour la prise en charge des maladies auto-immunes.

➤ [Natalizumab](#)

Le Natalizumab est un anticorps monoclonal humanisé ciblant l'interaction VCAM-1/VLA-4. Il est plus précisément dirigé contre l'intégrine $\alpha 4$. Cet anticorps a été développé pour le traitement de maladies auto-immunes et notamment des formes rémittentes de sclérose en plaques (ou SEP). Ce traitement a été approuvé en 2004 par la FDA (Natalizumab, Tysabri®). En inhibant l'interaction VCAM-1/VLA-4, le Natalizumab empêche la transmigration des leucocytes à travers l'endothélium vers les tissus parenchymeux inflammatoires (Li et al., 2015). L'inhibition de cette interaction est néanmoins susceptible d'affecter le fonctionnement du système immunitaire et certains patients développent des leucoencéphalopathies multifocales progressives (LEMP). On estime l'incidence de la LEMP à 1 pour 1000 (Yousry et al., 2006).

Le recours au Natalizumab a été suggéré en oncologie. Il a été montré dans des modèles de souris humanisées de myélome multiple d'une part (i) des effets anti-tumoraux par inhibition des interactions cellules tumorales-cellules stromales de la moelle osseuse, et d'autre part (ii) des effets chimio-sensibilisateurs du Natalizumab (Podar et al., 2011). L'utilisation d'anticorps ciblant cette interaction, dans des modèles murins, inhibe le développement du myélome multiple (Mori 2004 ; Olson et al., 2005). Du fait du mode d'action de ces anticorps et du rôle de VCAM-1 dans la progression tumorale, de tels agents pourraient à terme s'intégrer dans l'arsenal thérapeutique du clinicien.

➤ Petites molécules

Dans le but de réduire le risque de LEMP, des petites molécules dirigées contre la sous-unité $\alpha 4$ de VLA-4 ont récemment été développées. Parmi elles, AJM300 est un inhibiteur développé pour le traitement de la colite ulcéreuse ou encore la maladie de Crohn (Yoshimura et al., 2015; Sugiura et al., 2013). L'innocuité du traitement oral (aucune LEMP développée chez 102 patients traités 3 fois par jour pendant 8 semaines) a été démontrée dans ces applications (Yoshimura et al., 2015). Néanmoins, devant le temps de suivi très court et le faible nombre de patients, d'autres études sont nécessaires afin d'estimer le risque à long terme de LEMP.

5. Intérêt de l'imagerie phénotypique des tumeurs du sein exprimant VCAM-1

Comme nous l'avons évoqué, les mécanismes d'adhésion cellulaire et l'interaction VCAM-1/VLA-4 sont au cœur des phénomènes de dissémination métastatique. Dans le cadre de l'imagerie phénotypique qui fait l'objet de cette thèse, nous nous sommes tournés vers VCAM-1. Si l'expression de VCAM-1 semble être étroitement associée aux phénomènes de dissémination métastatique, notamment dans le cancer du sein, la valeur pronostique de son expression n'a jamais été investiguée dans la maladie métastatique.

De plus, même si d'autres études sont nécessaires, les thérapies ciblant l'interaction VCAM-1/VLA-4 pourraient, dans une perspective plus lointaine, s'intégrer dans le cadre d'une combinaison de thérapies (chimiothérapie, radiothérapie) pour la prise en charge des cancers du sein métastatiques. D'autres études sont néanmoins nécessaires pour valider la tolérance de ces traitements à long terme.

6. Agents d'imagerie ciblant VCAM-1 en cancérologie

Peu de travaux sur l'imagerie nucléaire des tumeurs exprimant VCAM-1 ont jusqu'à présent été publiés. Seuls deux agents ciblant VCAM-1 ont vu le jour en imagerie nucléaire : un peptide marqué à l'Indium 111 ($^{111}\text{In-tVCAM-4}$) et un scFv marqué au Gallium 68 ($^{68}\text{Ga-NOTA-VCAM-1scFv}$) (Zhang et al., 2018 ; Scalici et al., 2013). $^{111}\text{In-tVCAM-4}$ a été évalué sur un modèle murin de cancer ovarien métastatique. Cet agent d'imagerie TEMP a été validé pour le diagnostic de métastases péritonéales, mais aussi comme indicateur de réponse au traitement par le platinium, VCAM-1 ayant été identifié comme un marqueur de résistance à celui-ci. Plus récemment, $^{68}\text{Ga-NOTA-VCAM-1scFv}$, un fragment d'anticorps marqué au ^{68}Ga , a été développé pour l'imagerie TEP. La capacité de cet agent à cibler VCAM-1 a été évalué dans des modèles de greffes syngéniques de mélanome. La fixation du traceur plus importante dans les tumeurs exprimant VCAM-1 par rapport à celles ne l'exprimant pas est en faveur d'une fixation spécifique sur VCAM-1. (figure 108) (Zhang et al., 2018).

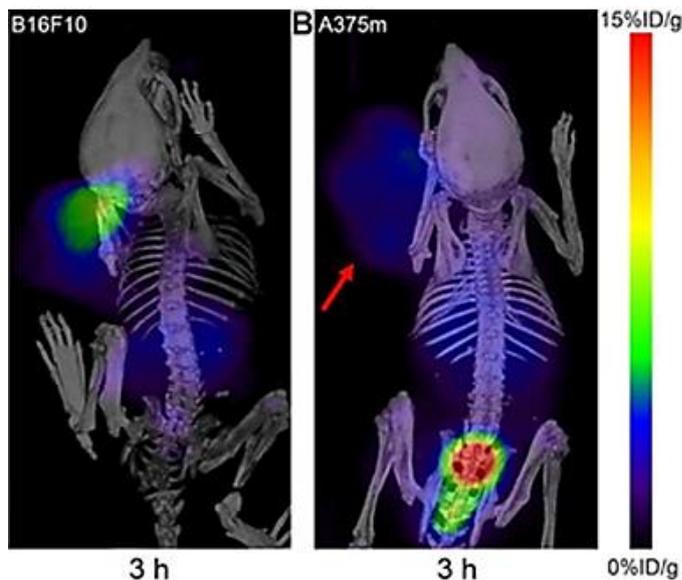


Figure 108. Images TEP-TDM obtenues sur des souris porteuses de tumeur B16F10 (VCAM-1+) à gauche ou A375m(VCAM-1-) à droite réalisées 3 heures après injection de $^{68}\text{Ga-NOTA-VCAM-1scFv}$. (Zhang X et al., 2018).

Un autre radiotracer ciblant la protéine VCAM-1 a récemment été développé au sein de notre laboratoire (Broisat et al., 2012; Broisat et al., 2014). Il s'agit d'un nanobody appelé $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$, développé pour la détection des plaques d'athérome vulnérables, une pathologie inflammatoire de la paroi vasculaire. Le radiotracer présente une excellente affinité pour sa cible, de l'ordre du nanomolaire. *In vivo*, $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ a permis la mise en évidence, en imagerie TEMP, des plaques d'athérome vulnérables grâce à une activité sanguine faible permettant l'obtention d'un rapport signal sur bruit de fond très satisfaisant. La spécificité et la sensibilité de ce traceur ont par ailleurs été démontrées (figure 109) (Dumas et al., 2017 ; Broisat et al., 2014) . Devant ces données prometteuses, un transfert en clinique est en cours dans cette indication et la première injection à l'homme est prévue pour le printemps 2019.

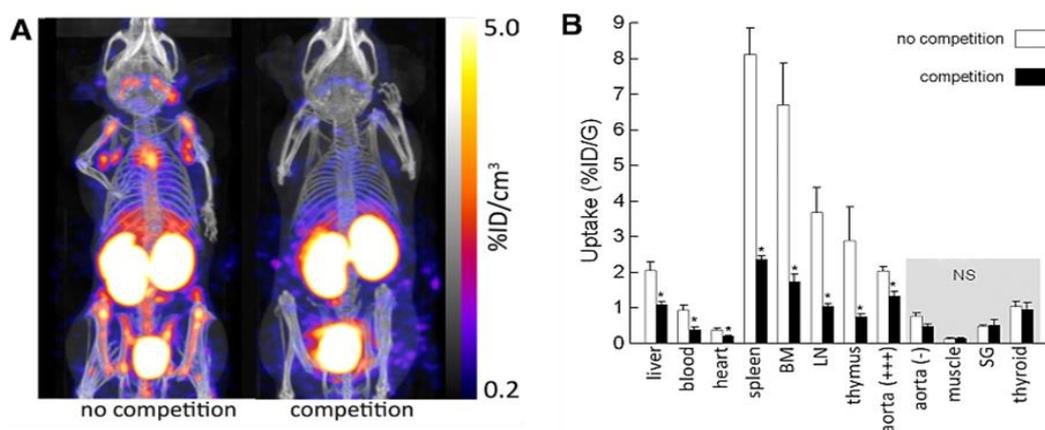


Figure 109. $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$, traceur des plaques d'athéromes vulnérables. $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ a été injecté seul ou en compétition avec un compétiteur non marqué en excès (cAbVCAM1-1). A) Images TEMP-TDM réalisées 2 h après injection. B) Biodistribution par prélèvements d'organes réalisée 3 h après injection. L'ajout du compétiteur diminue la fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ dans les lésions athéromateuses ainsi que dans les organes lymphoïdes (thymus, rate, moelle osseuse (BM), ganglions (LN)). $P < 0,05$ vs sans compétition (Broisat et al., 2012).

Partie expérimentale

Partie expérimentale

Objectif du travail expérimental

La deuxième partie de ce travail de thèse a porté sur l'imagerie des tumeurs du sein exprimant VCAM-1. Si les premières études ont permis de montrer que VCAM-1, via son expression sur les cellules endothéliales, permet l'arrimage des cellules tumorales à l'endothélium, les récentes études menées dans le champ de la génomique tumorale ont permis d'identifier VCAM-1 comme un acteur de la progression tumorale, à travers son expression sur les cellules tumorales. Ces dernières études ont notamment permis de démontrer le rôle de VCAM-1 dans la dissémination métastatique des tumeurs du sein au niveau du parenchyme pulmonaire mais aussi au niveau du tissu osseux. De plus, les données cliniques suggèrent que l'expression de VCAM-1 dans le cancer du sein est associée à une rechute précoce. Néanmoins, la valeur pronostique de VCAM-1 dans la maladie métastatique n'a jamais été évaluée. Pouvoir disposer d'un agent d'imagerie permettant la mesure de son expression permettrait de l'évaluer.

Au cours de cette deuxième partie, nous avons évalué la capacité de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5, radiotracer développé au laboratoire, à cibler les tumeurs du sein exprimant VCAM-1 dans une modèle de greffes sous-cutanées et un modèle expérimental de métastases pulmonaires.

Dans cette deuxième partie de thèse, nous avons réalisé l'imagerie phénotypique des tumeurs exprimant VCAM-1 dans des modèles murins de cancer du sein.

Matériels et Méthodes

1. Etudes *in vitro*

1.1 Culture cellulaire

Les mêmes lignées que celles utilisées lors de l'évaluation des ligands de la mésothéline ont été sélectionnées pour les études concernant VCAM-1. La lignée MDA-MB-231 est en effet connue pour exprimer VCAM-1 constitutivement (Wang et al., 2014). De plus, cette expression est augmentée lors d'une stimulation au TNF- α ou d'une stimulation au TGF- β . De la même façon que pour l'étude MSLN, les cellules MDA-MB-231 et HCC70 ont été respectivement cultivées en milieu DMEM et RPMI-1640, avec les mêmes suppléments qu'indiqués dans la partie MSLN (voir partie I mésothéline, matériels et méthodes, 1.1 culture cellulaire, pages 132-133).

1.2 Détermination de l'expression de VCAM-1

➤ qRT-PCR

L'expression de VCAM-1 a d'abord été mesurée par PCR en temps réel. Les cellules MDA-MB-231 et HCC70 ont été stimulées ou non au TNF- α pendant 18 h et les ARNm totaux ont été extraits, rétro-transcrits en ADN complémentaire (ADNc) et amplifiés.

- Principe de la qPCR

La PCR ou réaction de polymérisation en chaîne a pour but d'amplifier une séquence génomique d'intérêt. Dans le cas présent il s'agit de l'ADNc codant pour VCAM-1. Elle mesure un nombre d'amplicons, c'est-à-dire une portion d'ADN définie par un couple d'amorces. La PCR quantitative en temps réel ou qPCR est une application de la PCR. Cette méthode permet de suivre en continu le processus d'amplification en détectant la fluorescence émise par les produits néo-formés au cours de la PCR. Plus il y a de molécules cibles à l'origine, plus le nombre de cycles

d'amplification nécessaires pour atteindre un nombre déterminé de molécules amplifiées sera réduit.

La cinétique complète de la réaction permet d'obtenir une quantification absolue de la quantité d'ADN cible. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'amplicon est mesurée grâce à un marqueur fluorescent. Ici, l'ADN amplifié est révélé par le Sybr Green, molécule qui s'incorpore dans l'ADN double brin formé et dont la fluorescence est proportionnelle à la quantité de celui-ci (figure 110). A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée par l'incorporation du Sybr Green.

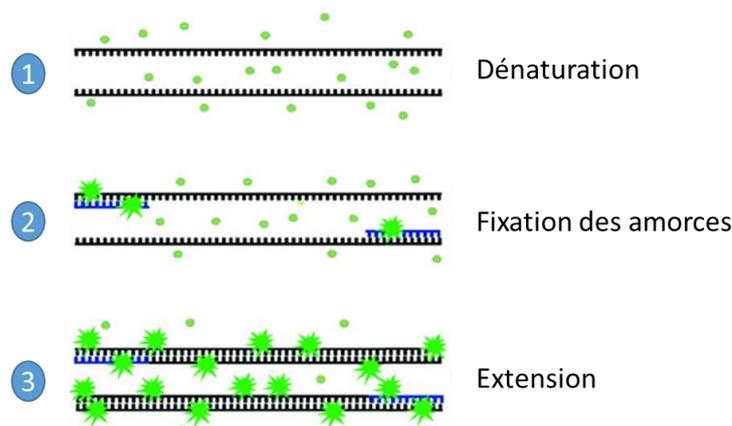


Figure 110. Schéma de l'incorporation du SYBR Green dans le double brin néoformé. Lors de la réaction de PCR (1), le SYBR green libre émet peu de fluorescence. Durant l'étape d'hybridation (2) puis d'élongation (3) une augmentation de la fluorescence est associée à la quantité de SYBR green fixant l'ADN double brin en cours de formation.

Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant. Plus l'échantillon est concentré en ARN cible, moins de cycles seront nécessaires pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le Ct et apparaît en début de phase exponentielle. Le nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence atteigne la valeur seuil est donc inversement corrélé au nombre de molécules cibles à l'origine. Trois phases distinctes sont visibles (figure 110) :

- Phase de bruit de fond : La quantité du fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent.

- Phase exponentielle : La quantité du fragment amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil.
- Phase de plateau : Certains composants de la réaction deviennent limitants.

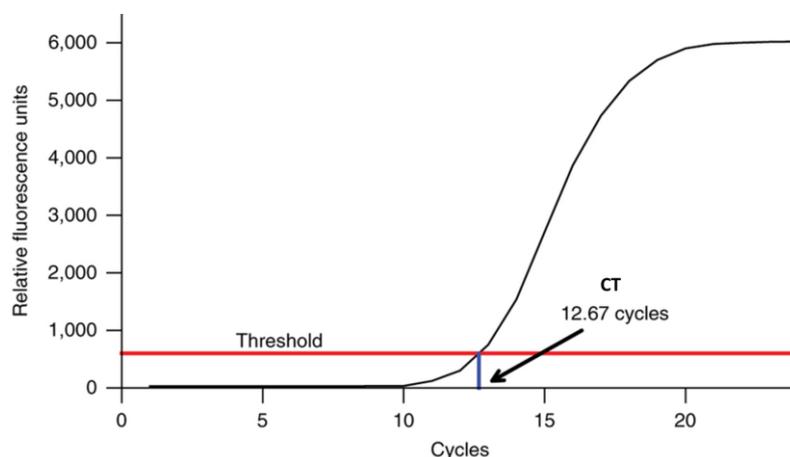


Figure 111. Exemple d'un profil d'amplification d'une séquence génomique avec placement du seuil et détermination du Ct. Les 3 phases de l'amplification de la séquence génomique sont clairement identifiables sur ce graphique.

Il existe plusieurs façons d'exprimer les résultats obtenus. Elles sont rappelées dans le tableau ci-dessous.

ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
Il représente la différence entre le Ct de la séquence d'intérêt et celui de la séquence de référence	Il représente la différence de Ct entre la condition 1 et la condition contrôle	Il représente le changement d'expression relatif entre deux conditions

- Méthode utilisée

Sept-cent mille cellules HCC70 ou MDA-MB-231 ont été ensemencées dans leur milieu respectif à J 0 dans une flasque T-25. Le lendemain, les cellules ont été traitées ou non avec 50 ng / mL de TNF- α (Peprotech) pendant 18 h. Les cellules ont alors été rincées avec du PBS sans Ca²⁺ et sans Mg²⁺, puis recouvertes de

trypsine 0,05 %, EDTA 0,02 % en PBS sans Ca²⁺ et sans Mg²⁺. Les cellules ont alors été placées 5 minutes dans l'incubateur à 37 °C sous atmosphère humide contenant 5 % CO₂. L'action de la trypsine a été stoppée par l'ajout de milieu complet. Les cellules ont alors été reprises dans un tube de centrifugation et sédimentées par centrifugation à 200 g pendant 5 minutes. Le culot a alors été suspendu dans 350 µL de tampon de lyse contenant 3,5 µL de β-mercaptoéthanol et les ARN totaux ont été extraits grâce à un kit commercial (PureLink® RNA Mini Kit. Ambion by Life Technologies). Les ARN ont ensuite été dosés avec un spectrophotomètre UV-visible à spectre complet (Thermo Scientific™ NanoDrop 2000). Trois-cent (300) ng d'ARN totaux ont été rétro-transcrits en utilisant le Supermix iScript™ Transcription (Biorad) et en appliquant le programme suivant au thermocycleur (Applied Biosystem StepOne Plus, Real-time PCR System):

Hybridation	5 min à 25 °C
Reverse Transcription	20 min à 46 °C
Inactivation RT	1 min à 95 °C

L'expression de VCAM-1 a ensuite été déterminée par qPCR. Un milieu réactionnel a d'abord été préparé. Il contenait :

- Des amorces Forward (ou sens) qui se fixent sur le brin d'ADN dont la séquence a été analysée.
- Des amorces Reverse (ou anti-sens) qui se fixent sur le brin complémentaire. Ces séquences sont rappelées dans le tableau ci-dessous.

Amorces	Forward	Reverse
VCAM-1 humain	AGTTGAAGGATGCGGGAGTA	ACCCCTTCATGTTGGCTTTTC
Actine	CTCCTGAGCGCAAGTACTCC	TGTTTTCTGCGCAAGTTAGG

Le tout a été mis en présence d'un mix SYBR® Green contenant une sonde fluorescente, des dNTPs et la polymérase (Fast SyberGreen Master Mix,

Thermofisher scientific) sur une plaque 96 puits. La composition finale des puits est rappelée dans le tableau ci-dessous.

cDNA	2 μ L
Primer F VCAM-1 ou Actine F (10 μ M)	0,5 μ L
Primer R VCAM-1 ou Actine R (10 μ M)	0,5 μ L
Sybr Green	5 μ L
Eau distillée	2 μ L

La PCR a été réalisée en appliquant le programme suivant:

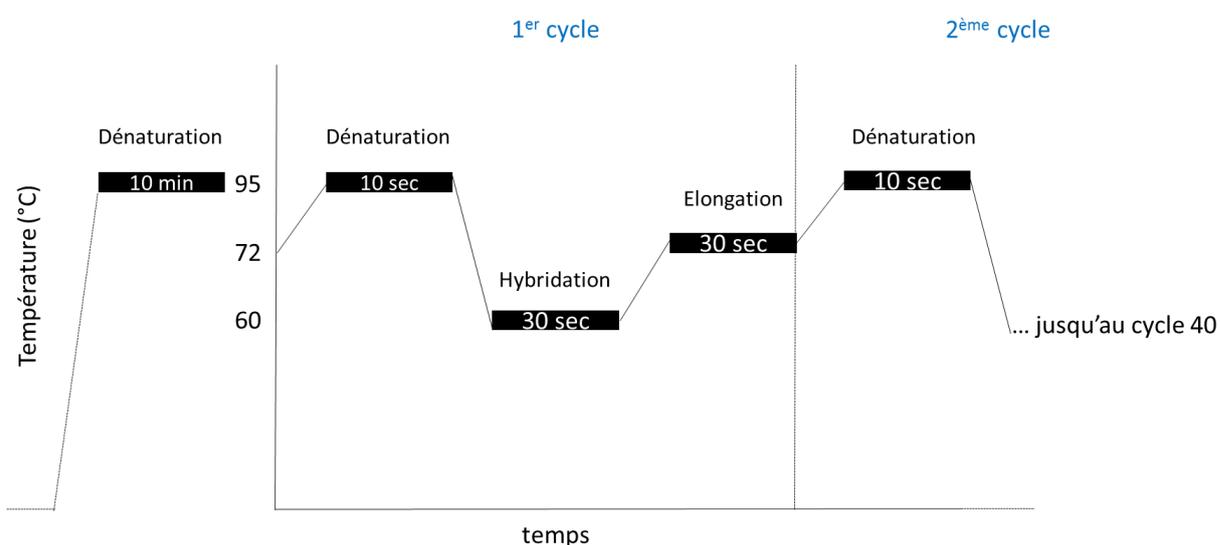


Figure 112. Programme appliqué au thermocycleur pour amplifier les ADNc codant pour VCAM-1 ou l'actine.

➤ [Western Blot](#)

Deux-cent cinquante mille cellules MDA-MB-231 ou HCC70 ont été ensemencées en plaque 6 puits à J 0. Le lendemain, les cellules ont été traitées ou non avec 50 ng/mL de TNF- α pendant 18 h. Les protéines totales ont été extraites comme précédemment décrit (partie I, matériel et méthodes, 1.2, pages 136-137). Les lysats protéiques ont été déposés sur un gel d'acrylamide (7,5 % Mini PROTEAN® Bio-Rad). En parallèle des échantillons, un marqueur de taille a été

déposé (5 μ L Prism Ultra Protein Ladder 10-180 kDa, ab116027). Les protéines ont été séparées par électrophorèse, réalisée à 130 V pendant 60 min (Mini PROTEAN® Tetra System, BIO-RAD). Une fois séparées, les protéines ont alors été transférées (Trans-Blot® Turbo™ Transfert system, Bio-Rad) sur une membrane de nitrocellulose. La membrane de nitrocellulose a été saturée pendant 1 h avec du TBS-Tween 0,1 %-BSA 1 % sous agitation. La membrane a ensuite été incubée avec un anticorps anti-VCAM-1 (1/2000, Abcam® ab134047) sur la nuit à 4 °C sous agitation. La membrane a ensuite été lavée 3 fois 5 min avec du TBS-Tween 0,1 %, puis incubée avec un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase de Raifort (HRP) (1/2000, Dako), dilué dans la solution de blocage pendant 1 h à température ambiante. La membrane a alors ensuite été lavée 3 fois 5 min avec du TBS-Tween 0,1 %. La révélation a été réalisée à l'aide de l'appareil Chemidoc™ MP system (Bio-Rad).

➤ Immunofluorescence

Des études en immunofluorescence ont également été réalisées afin de déterminer l'expression de VCAM-1 dans les cellules tumorales. Des lamelles en verre de diamètre 12 mm² ont été placées dans des puits de plaque 24 puits, puis rincées une fois au PBS et traitées pendant 10 min à 37 °C à la poly-lysine. Elles ont ensuite été rincées au PBS. Vingt-mille cellules MDA-MB-231 et HCC70 ont étéensemencées dans les puits, dans leur milieu respectif. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules ont été traitées ou non au TNF- α (50 ng/mL) pendant 18 h. Les cellules ont alors été rincées une fois au PBS et fixées à la PFA 4 % pendant 5 minutes. Une étape de saturation a été réalisée au PBS-BSA 2 % pendant une heure à température ambiante. Les cellules ont ensuite été incubées avec un anticorps anti-VCAM-1, dilué dans le tampon de saturation, pendant 1 h à température ambiante (1/2000 Abcam® ab134047). Les cellules ont ensuite été lavées 3 fois au PBS-BSA 2 % puis incubées avec un anticorps anti-IgG de lapin couplé au fluorochrome Alexa488 pendant 1 h à température ambiante (Abcam® ab150077). Après lavages, les noyaux des cellules ont été colorés au Hoescht pendant 5 min à température ambiante. Les lamelles ont ensuite été déposées sur des lames en présence d'une goutte de liquide de montage (Moviol). Les lames ont

été observées en microscopie à fluorescence (Zeiss Axioplan 2).

1.3 Mesure de la fixation du nanobody cAbVCAM1-5 en cytométrie en flux

La fixation du nanobody anti-VCAM-1 cAbVCAM1-5 sur les cellules HCC70 et MDA-MB-231 a été analysée en cytométrie en flux. Cette expérience a été réalisée à l'Institut For Advanced Biosciences (IAB, Grenoble) avec un FACS Accuri C6 BD. Les cellules HCC70 et MDA-MB-231 ont étéensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 250 000 cellules/mL. Le lendemain, elles ont été traitées ou non avec 50 ng/mL de TNF- α pendant 18 h. Elles ont ensuite été rincées avec du PBS sans Ca²⁺ et sans Mg²⁺, et décollées avec une solution à 5 mM d'EDTA contenue dans du PBS sans Ca²⁺ et sans Mg²⁺. Les cellules de chaque puits ont été réparties dans 2 tubes à hémolyse. Après 5 min de centrifugation à 200 g et à 4 °C, les cellules ont été resuspendues dans du PBS-BSA 2 % (étape de saturation) durant 30 min sur la glace. Après centrifugation et élimination du surnageant, les cellules ont été incubées avec le nanobody cAbVCAM1-5 (20 μ g/mL) ou le nanobody contrôle cAbBcII10a (20 μ g/mL, contrôle isotypique) dans du PBS-BSA 2 % pendant 30 min sur la glace. Les cellules ont ensuite été lavées avec 2 mL de PBS puis centrifugées à 200 g durant 5 min, à 4 °C. Le surnageant a alors été éliminé et les cellules incubées avec un anticorps anti-histidine de lapin (1/200, anti-6x His tag® antibody, ab9108 Abcam) durant 30 min sur la glace. Après un lavage, les cellules sont incubées avec un anticorps anti-IgG de lapin fluorescent (1/500, goat anti-Rabbit IgG H&L, AlexaFluor® 488, ab150077 Abcam). Enfin, après un dernier lavage au PBS, les cellules ont été resuspendues dans 250 μ L de PBS et les échantillons analysés au cytomètre de flux. Lors de l'acquisition, les cellules ont été sélectionnées en fonction de la taille et de la granulométrie. La fluorescence nulle (ou zéro) est définie par celle du contrôle isotypique. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à l'expression de l'antigène VCAM-1, présent à la surface des cellules.

1.4 Radiomarquage de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5

Le nanobody cAbVCAM1-5 a été radiomarqué au ^{99m}Tc sur son site spécifique « tag polyhistidine » via la méthode tricarbonyle et de la même façon que les nanobodies A1 et C6 (voir partie I, matériels et méthodes, 1.4, page 138). Cependant, l'étape d'incubation entre le précurseur Tc-tricarbonyle et la solution de cAbVCAM1-5 (1mg/mL) s'est déroulée pendant 45 min à 75 °C et non pendant 1 h à 60 °C.

1.5 Mesure de la fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5

La fixation de cAbVCAM1-5 radiomarqué (^{99m}Tc -cAbVCAM1-5) sur les cellules HCC70 et MDA-MB-231 a ensuite été étudiée *in vitro*. Douze mille (12 000) cellules MDA-MB-231 et 15 000 cellules HCC70 ont étéensemencées dans des puits de plaques 96 puits à J 0. Le lendemain, les cellules ont été traitées ou non au TNF- α (50 ng/mL) pendant 18 h. Elles ont ensuite été rincées une fois au PBS et fixées pendant 5 min avec de la PFA 4 %. Les cellules ont ensuite été lavées au PBS. Une étape de saturation avec du PBS-BSA 2 % a ensuite été réalisée pendant 1 h à température ambiante. Les cellules ont alors été incubées pendant 1 h avec 30 nM de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 avec ou sans 6 μM de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 non radiomarqué. Les cellules ont finalement été lavées 5 fois avec du PBS. La radioactivité de chaque puits a été comptée au compteur Wizard².

2. Etudes *in vivo* : Modèle de tumeurs greffées en sous-cutanée

2.1 Modèle animal

Toutes les procédures d'expérimentation animale ont été acceptées par le comité d'éthique de l'Université Grenoble Alpes (Cometh Grenoble, CEEA n°12) et autorisées par le ministère l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation (MESRI). Des souris femelles BALB/c Nude (Janvier Lab) ont été utilisées pour les différentes expérimentations. Du fait de leur déficience en LT, les souris ont été placées dans des cages avec filtre, dans une armoire ventilée autonome, à 25 °C et 30 à 50 % d'hygrométrie. La nourriture et l'eau de boisson ont été stérilisées et fournies *ad libitum*. Les cages, les litières et l'eau ont été changées 2 fois par semaine. Lors de leur manipulation (suivi de poids, suivi de la croissance tumorale) les souris ont été placées sous une hotte à flux laminaire.

La veille de l'implantation tumorale, le milieu de culture cellulaire a été renouvelé pour optimiser l'état des cellules. Douze souris femelles âgées de 5 semaines ont été implantées sur la patte arrière gauche par voie sous-cutanée, avec 3 M de cellules MDA-MB-231 dans un mélange PBS-Matrigel® haute concentration (Corning) 2:1, dans un volume final de 180 µL, à l'aide d'une seringue 26 G. L'implantation tumorale en Matrigel® nécessite de travailler à 4 °C. La veille de l'implantation, le Matrigel® a donc été placé à 4 °C afin qu'il devienne liquide, et le matériel servant à l'implantation (seringues, cônes, tubes) a été placé au congélateur. L'implantation s'est déroulée sous anesthésie volatile, à l'aide d'un mélange Air-O₂-Isoflurane 2 %. Dix jours plus tard, les 12 souris ont de nouveau été anesthésiées sous anesthésie volatile et ont été implantées sur la patte arrière droite avec 3 M de cellules HCC70 dans un mélange PBS-Matrigel® 2:1. L'implantation des cellules HCC70 a été décalée du fait de leur temps de doublement *in vivo* qui est supérieur à celui des MDA-MB-231. Ceci est réalisé dans le but d'avoir des volumes tumoraux équivalents le jour de l'imagerie et de la biodistribution.

➤ Suivi de la croissance tumorale

Après l'implantation, les souris sont observées quotidiennement. Elles sont également pesées 3 fois par semaine. Dès l'apparition de tumeurs, le volume tumoral est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse comme précédemment décrit. La formule du volume d'un ellipsoïde est appliquée. Un volume tumoral de 1500 mm³ a été défini comme point limite pour cette étude, conformément aux recommandations du comité d'éthique local. Etant donné que les souris sont porteuses de 2 tumeurs, la somme des 2 volumes a été calculée. Elle était inférieure à 1500 mm³ chez les 12 souris. Comme précédemment, tout signe de prostration, de faiblesse ou une perte de poids > 20 % ont été considérés comme des points limites. Aucun des points limites n'a été atteint durant l'expérimentation.

2.2 Injection du traceur

Dès que les tumeurs ont atteint un volume compris entre 100 et 200 mm³, les animaux ont été placés 1-2 minutes près d'une lampe à infrarouge pour dilater les veines de la queue. Les souris ont alors été injectées avec le radiotracer ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 ou le radiotracer contrôle, ^{99m}Tc-ctle. Les différents groupes constitués sont rappelés dans le tableau ci-dessous. Les volumes des tumeurs MDA-MB-231 et HCC70 les jours des expérimentations étaient respectivement de 140 ± 33 mm³ et 153 ± 41 mm³.

Tumeurs implantées	Nombre de souris	Molécules injectées	Activités injectées (MBq)
MDA-MB-231 et HCC70	6	^{99m} Tc-cAbVCAM1-5	62,8 ± 10,3
	6	^{99m} Tc-Ctle	57,2 ± 4,3

Tableau 15. Tableau récapitulatif des différents groupes constitués.

2.3 Imagerie corps entier et quantification de la fixation tumorale

Une heure après l'injection du radiotracer, les animaux ont été anesthésiés à l'isoflurane (2 % dans un mélange oxygène/air 1:1) et l'imagerie TEMP/TDM a

été réalisée à l'aide de la nano-SPECT-CT, caméra pré-clinique dédiée au petit animal (Bioscan/Mediso). Durant l'acquisition, la température des animaux a été régulée, et leur fréquence respiratoire monitorée afin d'ajuster, si nécessaire, le degré d'anesthésie. Une imagerie TDM (rayons X) a d'abord été réalisée avec les paramètres suivants : 45 kV, 240 projections, 500 ms par projection, puis une acquisition TEMP de 45 minutes pour le corps entier a été réalisée : 24 projections, 200 ms par projection. Les acquisitions TEMP et TDM ont été reconstruites afin d'obtenir des volumes tridimensionnels puis elles ont été fusionnées et analysées à l'aide du logiciel Nucline (Nucline, Mediso). Les analyses ont été effectuées avec le logiciel Vivoquant (Vivoquant, Invicro). Afin de quantifier la fixation tumorale des traceurs, un volume d'intérêt (sphère de 50 mm³) a été défini en se basant sur les images anatomiques obtenues grâce à l'image TDM. Comme auparavant, les résultats de la fixation tumorale du traceur ont été exprimés en % de la dose injectée rapporté au volume d'intérêt (% DI/cm³).

2.4 Etudes de biodistribution

Deux heures après l'injection du radiotracer, et directement après l'imagerie TEMP/TDM, une biodistribution par prélèvements d'organes a été réalisée. Les animaux, toujours anesthésiés, ont été euthanasiés par inhalation de CO₂, puis les organes ont été prélevés, pesés et placés dans des tubes de comptage. La radioactivité a été comptée au compteur gamma (Wizard², PerkinElmer). La radioactivité des différents organes a été corrigée du poids de l'organe, de la décroissance radioactive et de la dose injectée (MBq). Les résultats ont été exprimés en % DI/g de tissu.

3 Etude *in vivo* : Modèle de métastases pulmonaires

3.1 Modèle animal

Toutes les procédures d'expérimentation animale ont été acceptées par le comité d'éthique de l'Université Grenoble Alpes (Cometh Grenoble, CEEA n°12) et autorisées par le ministère de la recherche. Des souris femelles C.B17 SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency) (Charles River) ont été utilisées pour les différentes expérimentations. Les souris ont été placées dans des cages stériles avec filtre, dans une armoire ventilée autonome, à 25 °C et 30 à 50 % d'hygrométrie. La nourriture et l'eau de boisson ont été stérilisées et fournies *ad libitum*. Les cages, les litières et l'eau ont été changées à raison de 2 fois par semaine. Lors de leur manipulation (suivi de poids) les souris ont été placées sous une hotte à flux laminaire. La veille de l'implantation tumorale, le milieu de culture des cellules MDA-MB-231 a été renouvelé pour optimiser l'état des cellules. Les cellules ont d'abord été décollées avec une solution de trypsine 0,05 %, EDTA 0,02% en PBS sans Ca²⁺ et sans Mg²⁺. Elles ont été resuspendues dans du PBS à raison de 7 M par mL. Neuf souris âgées de 5 semaines ont été injectées avec 1 M de cellules MDA-MB-231 contenues dans 150 µL de PBS, via l'une des deux veines latérales de la queue. L'injection a été réalisée sur des souris vigiles, placées dans un tube à contention.

3.2 Injection du traceur

Les études *in vivo* puis *ex vivo* ont été réalisées 8 semaines après injection des cellules tumorales MDA-MB-231. Les animaux ont été placés 1-2 minutes près d'une lampe à infrarouge, source de chaleur, afin de dilater les veines latérales de la queue. Les souris ont alors été placées dans un tube à contention et injectées avec le radiotracer ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 ou ^{99m}Tc-Ctle, par voie veineuse.

Tumeurs implantées	Nombre de souris	Molécules injectées	Activités injectées (MBq)
MDA-MB-231	5	^{99m} Tc-cAbVCAM1-5	68,4 ± 21,9
MDA-MB-231	4	^{99m} Tc-Ctle	56,1 ± 13,5

Tableau 16. Tableau récapitulatif des différents groupes constitués.

3.3 Imagerie des poumons et quantification de la fixation tumorale

Une heure après injection du radiotracer, les animaux ont été anesthésiés à l'isoflurane (2 % dans un mélange oxygène/air 1:1) et l'imagerie TEMP/TDM a été réalisée à l'aide de la nano-SPECT-CT, caméra pré-clinique dédiée au petit animal (Bioscan/Mediso). Durant l'acquisition, la température des animaux a été régulée et leur fréquence respiratoire monitorée afin d'ajuster, si nécessaire, le degré d'anesthésie. Une imagerie TDM (rayons X) a été réalisée en premier avec les paramètres suivants : 45 kV, 240 projections, 500 ms par projection, puis une acquisition TEMP de 45 minutes sur une région contenant les poumons et le foie, a été réalisée en utilisant les paramètres suivants : 24 projections, 200 ms par projection.

Les acquisitions TEMP et TDM ont été reconstruites afin d'obtenir des volumes tridimensionnels, puis elles ont été fusionnées à l'aide du logiciel Nucline (Nucline/Mediso). Les quantifications ont été effectuées à l'aide du logiciel Vivoquant (InVivo). Afin de quantifier la captation pulmonaire des traceurs, un volume d'intérêt englobant les poumons dans leur totalité a été défini en se basant sur les images anatomiques obtenues grâce à l'image TDM. Un exemple est présenté ci-dessous (figure 113). Les résultats de la fixation tumorale du traceur ont été exprimés en % de la dose injectée par organe (%DI) ou par cm³ de poumons (% DI/cm³). Cette grandeur correspond à l'activité fixée par centimètre cube de tissu, corrigée de la dose injectée (en MBq).

Vue latérale

Vue de face

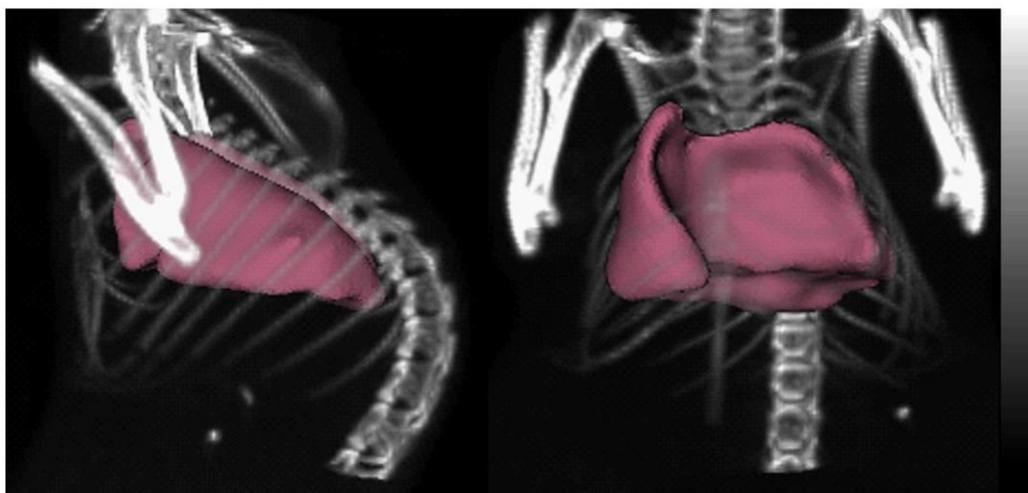


Figure 113. Exemple de délimitation du volume d'intérêt sélectionné pour quantifier la fixation pulmonaire de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ et $^{99m}\text{Tc-Ctle}$. Un volume d'intérêt englobant la totalité des poumons a été délimité sur la base de l'imagerie TDM, et est représenté en rose.

3.4 Etudes de biodistribution

Deux heures après l'injection du radiotracer, et directement après l'imagerie TEMP/TDM, une biodistribution par prélèvements d'organes a été réalisée. Les animaux, toujours anesthésiés, ont été euthanasiés par inhalation de CO_2 , puis les organes ont été prélevés, pesés et placés dans des tubes de comptage. La radioactivité a été comptée au compteur gamma (Wizard², PerkinElmer). La radioactivité des différents organes a été corrigée du poids de l'organe, de la décroissance radioactive et de la dose injectée (MBq). Les résultats ont été exprimés en % DI/g de tissu.

4 Etudes *ex vivo*

3.1 Quantification de la fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ par autoradiographie

Les poumons des souris SCID (modèle de métastases pulmonaires) contenant les foyers métastatiques ont été prélevés, remplis avec une solution de gel de congélation (PBS-OCT 20 %) puis congelés rapidement dans l'azote liquide. Ensuite, une partie des poumons a été placée dans du gel à congélation (OCT compound (Tissue Tek)) et congelée dans de l'isopentane à -40 °C. L'autre partie a été congelée pour les analyses en qRT-PCR. Des coupes de 20 μm d'épaisseur ont été réalisées à deux niveaux des tissus à l'aide d'un cryotome (HM505E, Microm), puis exposées sur la nuit, sur des films autoradiographiques sensibles aux émissions radioactives. Des coupes de tissus de référence (cœur, foie, muscle) dont la radioactivité a par ailleurs été déterminée en biodistribution par comptage gamma, ont également été exposées sur ces films. Ils ont alors été scannés à l'aide d'un phospho-imager (BAS5000, Fuji). Après exposition sur les films autoradiographiques, les tissus ont été fixés par incubation dans une solution d'acétone pendant 10 min à -20 °C. Une coloration hématoxyline-éosine (HE) a ensuite été réalisée afin de visualiser le cytoplasme (rose) et les noyaux (bleu). La fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ et $^{99m}\text{Tc-ctle}$ au sein des tumeurs et des foyers métastatiques pulmonaires a été déterminée en définissant des zones sur la base des colorations HE. Les résultats sont exprimés en % DI/g de tissu.

3.2 Analyse de l'expression de VCAM-1

➤ qRT-PCR

Les ARNm des tumeurs MDA-MB-231 et HCC70 xénogreffées en sous-cutanée et des nodules métastatiques MDA-MB-231 ont été extraits, rétro-transcrits en ADNc et amplifiés. L'expression des ARNm VCAM-1 humain et murin a été évaluée. Environ 50 mg de tumeurs HCC70 et MDA-MB-231 issus des xénogreffes et 50 mg de tissu pulmonaire contenant les nodules métastatiques ont été repris dans 500 μL de tampon de lyse contenant 5 μL de β -mercaptoéthanol et les ARN totaux ont été extraits grâce à un kit commercial (PureLink® RNA Mini

Kit, Ambion by Life Technologies). Les ARN ont ensuite été dosés et rétro-transcrits comme décrit dans la partie *in vitro*.

L'expression de VCAM-1 a ensuite été déterminée par qPCR. Les séquences des sondes utilisées sont rappelées dans le tableau ci-dessous.

Amorces	Forward	Reverse
VCAM-1 humain	AGTTGAAGGATGCGGGAGTA	ACCCCTTCATGTTGGCTTTTC
VCAM-1 souris	GCCACCCTCACCTTAATTGC	TCAGAACAACCGAATCCCA
Actine	CTCCTGAGCGCAAGTACTCC	TGTTTTCTGCGCAAGTTAGG

Le même programme que celui précédemment utilisé pour les analyses *in vitro* a été appliqué ici.

5 Analyse statistique

Les données ont été exprimées sous forme de moyenne \pm écart-type. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Un test de Mann-Whitney a été utilisé pour les comparaisons entre chaque groupe. Le seuil de significativité a été établi à $p < 0,05$.

Résultats

1. Etudes *in vitro*

1.1 Mesure de l'expression de VCAM-1

➤ RT-qPCR

L'expression de VCAM-1 a dans un premier temps été déterminée par PCR en temps réel (figure 114). Les cellules HCC70 et MDA-MB-231 ont été stimulées ou non au TNF- α , lysées et les ARNm totaux ont été extraits et rétro-transcrits en ADNc, puis une PCR en temps réel a été effectuée. Que ce soit en condition basale ou après une stimulation au TNF- α , les cellules HCC70 n'expriment pas l'ARNm de VCAM-1 : aucun signal détectable n'est obtenu dans les 2 cas. Les cellules MDA-MB-231 quant à elles expriment VCAM-1 en condition basale, et cette expression est multipliée par 3,5 après stimulation au TNF- α ($p < 0,05$).

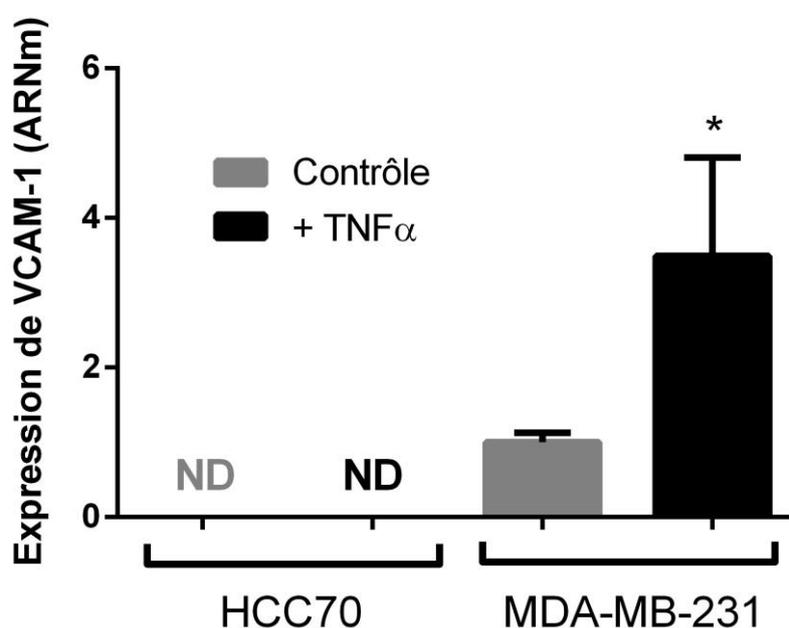


Figure 114. Mesure de l'expression de VCAM-1 en qRT-PCR. Les résultats sont exprimés en expression relative vs MDA-MB-231. ND : Non détectable. * $p < 0,05$ vs MDA-MB-231.

➤ [Western Blot](#)

L'expression de la protéine VCAM-1 des cellules tumorales HCC70 et MDA-MB-231 a été déterminée par Western Blot dans un premier temps (figure 115). Les cellules HCC70 stimulées ou non au TNF- α n'expriment pas VCAM-1. Les cellules MDA-MB-231 quant à elles expriment VCAM-1 en condition basale, et cette expression augmente après stimulation au TNF- α .

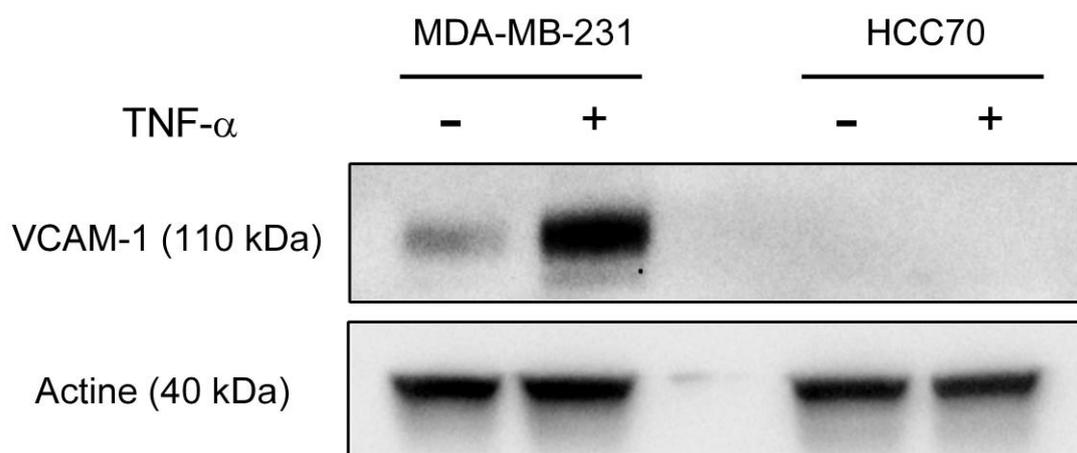


Figure 115. Caractérisation de l'expression de VCAM-1 des lignées HCC70 et MDA-MB-231 par Western Blot. Les cellules ont été traitées ou non pendant 18 h au TNF- α et l'expression de VCAM-1 a ensuite été évaluée en Western Blot.

Après quantification de la densité des bandes sur la membrane du Western Blot, on note une augmentation de l'expression de VCAM-1 des cellules MDA-MB-231 préalablement stimulées au TNF- α , d'un facteur 3 par rapport aux cellules non stimulées ($p < 0,05$, figure 116).

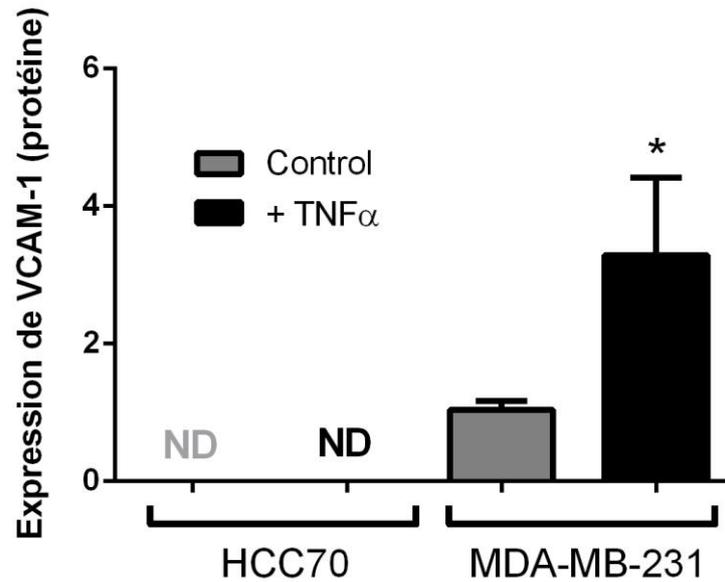


Figure 116. Mesure de l'expression de VCAM-1 par WB. Les bandes de WB ont été quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ. Les résultats sont exprimés en expression relative (vs MDA-MB-231). ND : Non détectable. * $p < 0,05$ vs MDA-MB-231.

➤ Immunofluorescence

L'expression de la protéine VCAM-1 a également été déterminée en immunofluorescence. Il a ainsi pu être confirmé que VCAM-1 n'est pas exprimée par les cellules HCC70 avec ou sans stimulation préalable au TNF- α . Les cellules MDA-MB-231 expriment VCAM-1 essentiellement après stimulation au TNF- α . L'expression de VCAM-1 par les cellules MDA-MB-231 en l'absence de toute stimulation au TNF- α est peu détectable en immunofluorescence (figure 117).

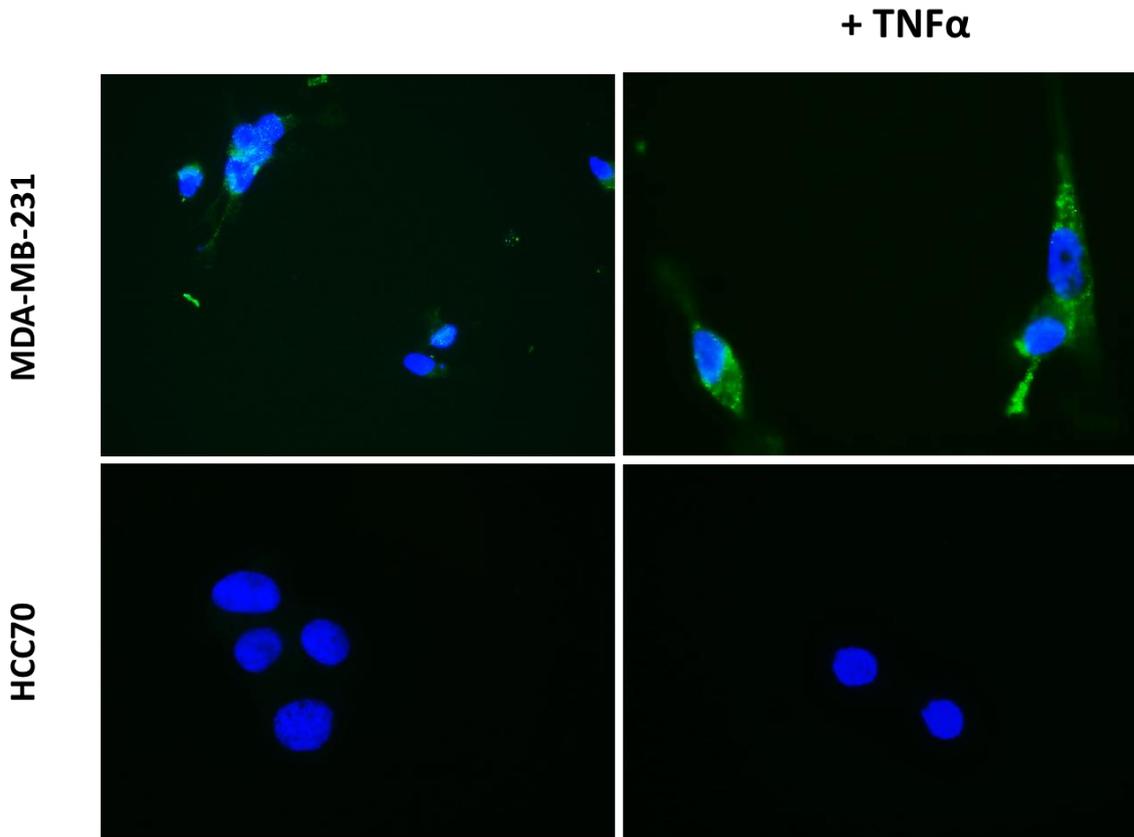


Figure 117. Détermination de l'expression de VCAM-1 par les cellules HCC70 et MDA-MB-231 en immunofluorescence. Les cellules HCC70 et MDA-MB-231 ont été stimulées au TNF- α pendant 18 h, fixées puis incubées avec un anticorps anti-VCAM-1.

1.2 Mesure de la fixation de cAbVCAM1-5 en cytométrie en flux

La capacité de cAbVCAM1-5 à se fixer *in vitro* sur les cellules exprimant VCAM-1 a ensuite été évaluée par cytométrie en flux (figure 118). Les cellules préalablement stimulées au TNF- α ont été incubées avec le nanobody cAbVCAM1-5 ou le nanobody contrôle. cAbVCAM1-5 ne se lie pas aux cellules HCC70, n'exprimant pas VCAM-1, qu'elles aient été stimulées ou non au TNF- α . En revanche, cAbVCAM1-5 se lie aux cellules MDA-MB-231 exprimant VCAM-1 constitutivement, et cette fixation est augmentée après la stimulation au TNF α .

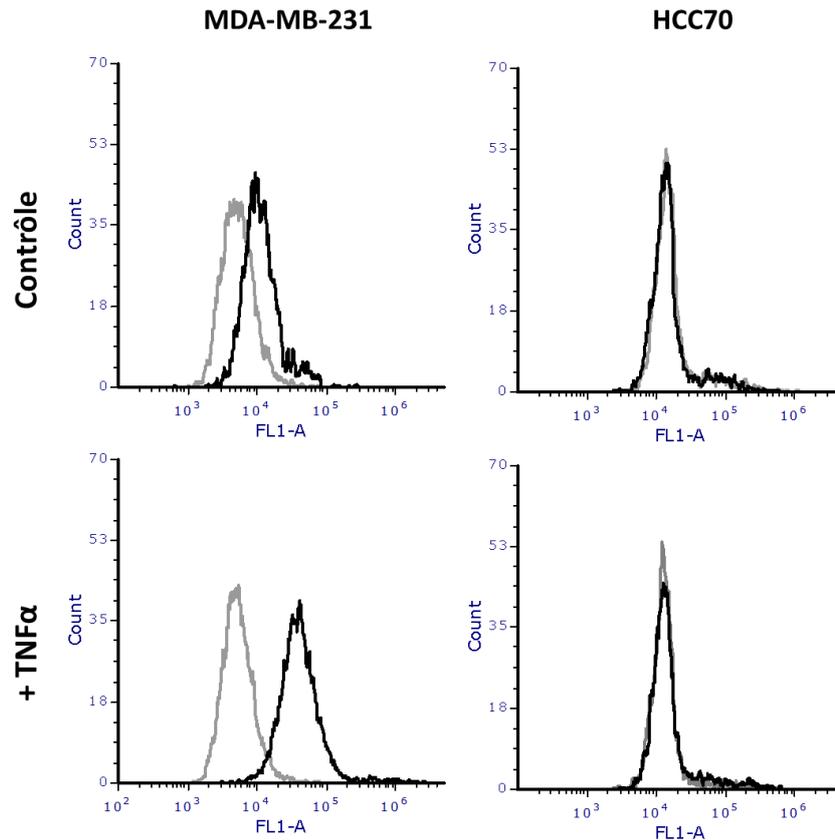


Figure 118. Mesure de la fixation de cAbVCAM1-5 sur les cellules MDA-MB-231 et HCC70 par cytométrie en flux. Les cellules ont été traitées avec 50 ng/mL de TNF- α pendant 18 h, puis incubées avec cAbVCAM-1 ou le nanobody contrôle.

1.3 Mesure de la fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5

Des tests de binding du nanobody ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 ont été effectués afin de déterminer la capacité et la spécificité de fixation du nanobody cAbVCAM1-5 après radiomarquage au technétium 99m (^{99m}Tc -cAbVCAM1-5), sur les cellules MDA-MB-231 stimulées ou non au TNF- α (figure 119). ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 se fixe spécifiquement sur les cellules en absence de stimulation au TNF- α . En effet, l'ajout d'un excès de cAbVCAM1-5 non radiomarqué diminue la fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 de 40 % ($p < 0,01$).

^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 se fixe 5 fois plus sur les cellules MDA-MB-231 stimulées au TNF- α que sur les cellules non stimulées ($p < 0,001$). L'ajout d'un excès

de cAbVCAM1-5 non marqué permet de diminuer la fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 de 90 % ($p < 0,001$), démontrant la spécificité de la liaison.

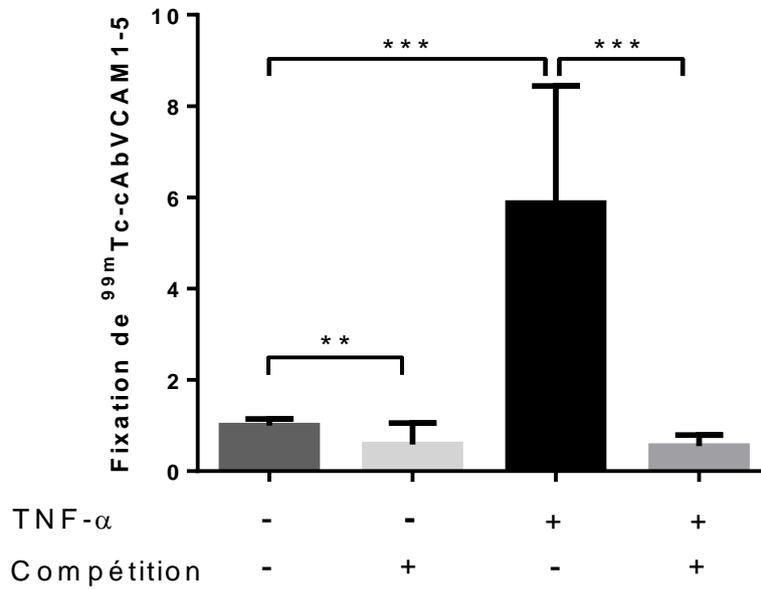


Figure 119. Mesure de la fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 sur les cellules MDA-MB-231. Les cellules traitées ou non au TNF- α ont été incubées avec 30 nM de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 avec ou sans excès de 150 fois le nanobody cAbVCAM1-5 non radiomarqué. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Bilan des expérimentations *in vitro*

Dans cette première partie relative à la caractérisation des lignées cellulaires MDA-MB-231 et HCC70 pour l'expression de VCAM-1 et la validation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 *in vitro*, nous avons pu montrer que la lignée HCC70 n'exprime ni l'ARNm ni la protéine VCAM-1 que ce soit en conditions basales ou après stimulation au TNF- α . En revanche, **la lignée MDA-MB-231 exprime l'ARNm codant pour la protéine et la protéine VCAM-1**. De plus, sur cette lignée cellulaire, le traitement au TNF- α induit une augmentation d'un facteur 3,5 de l'expression de l'ARNm et de la protéine. Les études menées en immunofluorescence confirment ce résultat même si la détection de l'expression de VCAM-1 des cellules MDA-MB-231 en condition basale est peu visible via cette méthode. L'évaluation par cytométrie en flux de la fixation du nanobody cAbVCAM1-5 a permis de démontrer la capacité de ce dernier à lier les cellules exprimant VCAM-1. Les études de compétition réalisées *in vitro* ont permis de montrer que **le nanobody ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 se fixait spécifiquement sur les cellules MDA-MB-231** et que le traitement au TNF- α augmentait sa fixation d'un facteur 5.

2. Etudes *in vivo* : Modèle de tumeurs greffées en sous-cutanée

2.1 Suivi du volume tumoral

Les tumeurs MDA-MB-231 et HCC70 ont été mesurées à raison de 2 fois par semaine, jusqu'à atteindre un volume compris entre 100 et 200 mm³ (figure 120). Les temps de doublement tumoraux ont été déterminés et sont semblables à ceux calculés lors de l'étude de biodistribution de la MSLN ($7,8 \pm 2,4$ jours pour les HCC70 et $12,5 \pm 3,8$ pour les MDA-MB-231).

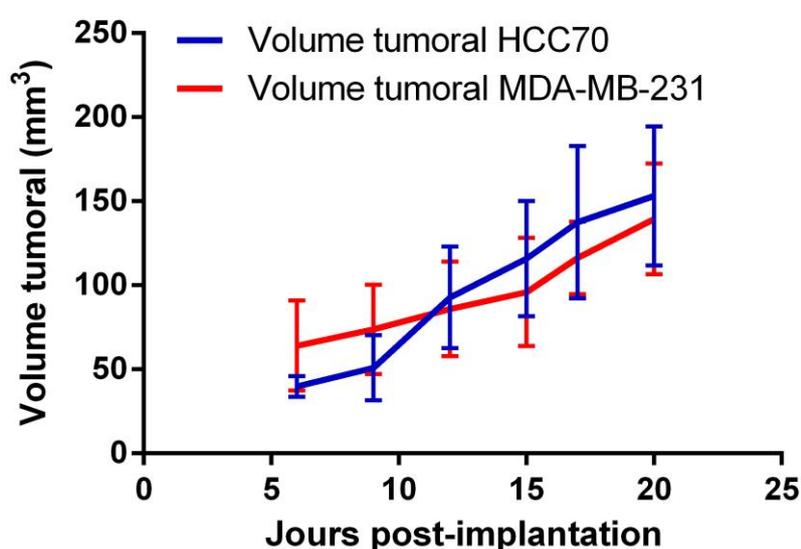


Figure 120. Suivi du volume tumoral des souris implantées en sous-cutanée avec des cellules HCC70 ou MDA-MB-231. J0 représente le jour d'implantation des tumeurs MDA-MB-231 et HCC70.

2.2 Analyse de la biodistribution de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5

2.2.1 Imagerie TEMP/TDM

Les souris BALB/c Nude porteuses de tumeurs MDA-MB-231 et HCC70 ont été injectées avec ^{99m}Tc-cAbVCAM-1-5 ou ^{99m}Tc-Ctle. Une heure après l'injection, les souris ont été imagées par TDM pour obtenir une image morphologique, puis en TEMP afin d'évaluer la biodistribution des traceurs. Des exemples représentatifs sont représentés dans la figure 121 ci-dessous, en coupes coronales et transversales. En niveau de gris est présentée l'image anatomique (TDM) et en

échelle de couleur est présentée l'image nucléaire (TEMP), avec une échelle allant de 0,2 à 5 % DI/cm³. Sur les coupes coronales et transversales, l'élimination urinaire des traceurs est clairement visible, de forts signaux sont observés dans les reins ainsi que dans la vessie. Concernant les fixations tumorales, ^{99m}Tc-Ctle ne s'accumule que très peu au sein des tumeurs HCC70 et des tumeurs MDA-MB-231. En revanche, la fixation de ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 au sein des tumeurs MDA-MB-231 est visible sur les coupes coronale et transversale.

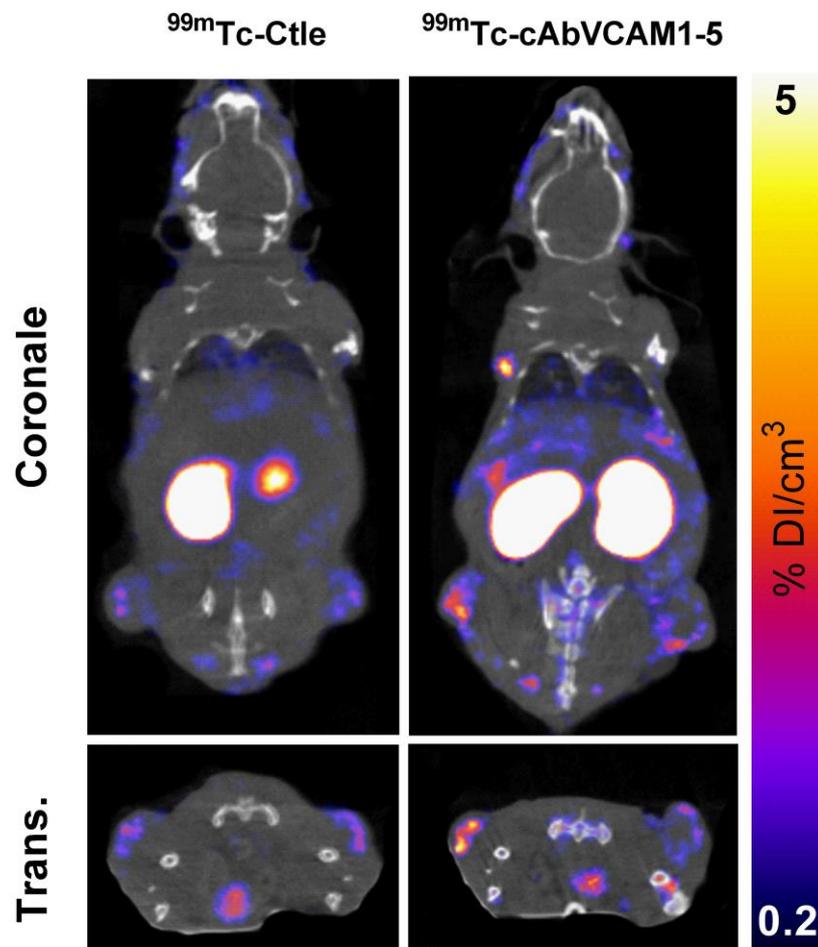


Figure 121. Imagerie TEMP/TDM de souris BALB/c Nude porteuses de tumeurs MDA-MB-231 (G) et HCC70 (D) 1 h après injection de ^{99m}Tc-Ctle (n=6) ou ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 (n=6). L'échelle est en % DI/cm³. Les images TEMP/TDM ont été réalisées 1 h après injection des traceurs. Des coupes coronales et transversales (trans.) sont présentées ici.

Des quantifications des fixations tumorales ont été réalisées sur la base des imageries TEMP (figure 122). La fixation de ^{99m}Tc -Ctle dans les tumeurs HCC70 ou MDA-MB-231 est faible ($0,72 \pm 0,15$ % DI/cm³ vs $0,54 \pm 0,07$ % cm³, respectivement, P=NS). ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 est près de 2 fois plus fixé sur les tumeurs MDA-MB-231 que sur les tumeurs HCC70 ($p < 0,05$). Les tumeurs MDA-MB-231 fixent plus de 3 fois plus le traceur ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 que le ^{99m}Tc -Ctle ($1,72 \pm 0,34$ % DI/cm³ vs $0,54 \pm 0,07$ % DI/cm³, $p < 0,01$). D'autre part, ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 est significativement plus fixé sur les tumeurs HCC70 que le ^{99m}Tc -Ctle ($p = 0,04$).

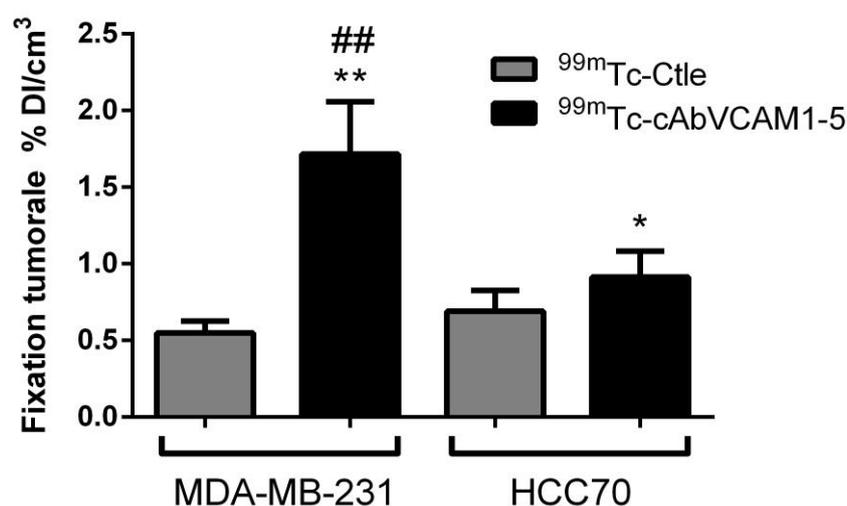


Figure 122. Quantification des fixations tumorales de ^{99m}Tc -Ctle ou ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 sur les images TEMP des souris BALB/c Nude porteuses de tumeurs MDA-MB-231 (G) et HCC70 (D). ## $p < 0,01$ vs HCC70 ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs ^{99m}Tc -Ctle.

2.2.2 Biodistribution par prélèvements d'organes

À l'issue de l'acquisition TEMP/TDM, les souris ont été euthanasiées par inhalation de CO₂ et la biodistribution des traceurs a été déterminée *ex vivo* par prélèvements d'organes. On observe une forte fixation du traceur ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 dans les organes lymphoïdes exprimant constitutivement la protéine VCAM-1 (ganglions, moelle osseuse, rate). Ces fixations sont toujours significativement supérieures à celles observées dans les mêmes organes avec le

traceur contrôle (tableau 17). Dans les autres organes analysés, à l'exception du rein et des intestins, la fixation du traceur $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ est toujours inférieure à 1 % DI/g, y compris dans le sang. L'élimination des nanobodies se faisant par voie rénale, on observe une très forte activité dans cet organe, dans les 2 groupes. Ceci est dû à la fois au mode d'élimination du radiotracer mais aussi à une recapture des molécules chargées positivement dans le cortex rénal. La fixation tumorale des traceurs $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ et $^{99m}\text{Tc-Ctle}$ a également été déterminée. Les tumeurs MDA-MB-231 fixent 2 fois plus $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ que les tumeurs HCC70 ($1,69 \pm 0,50$ vs $0,89 \pm 0,27$, $p < 0,01$). De même les tumeurs MDA-MB-231 fixent 4 fois plus $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ que le traceur contrôle ($p < 0,01$). De plus, les tumeurs HCC70 fixent 1,3 fois plus le traceur $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ que le traceur contrôle, mais cette différence n'est néanmoins pas significative.

Organes	$^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$	$^{99m}\text{Tc-Ctle}$
Cerveau	$0,03 \pm 0,02$	$0,01 \pm 0,01$
Estomac	$0,49 \pm 0,14$	$0,35 \pm 0,10$
Intestin	$1,20 \pm 0,48^{**}$	$0,26 \pm 0,06$
Foie	$0,73 \pm 0,18^{**}$	$0,44 \pm 0,11$
Coeur	$0,33 \pm 0,10^{**}$	$0,19 \pm 0,07$
Rein	$253,30 \pm 33,87^{**}$	$174,86 \pm 32,51$
Moelle osseuse	$6,45 \pm 2,38^{**}$	$0,53 \pm 0,24$
Rate	$8,18 \pm 1,19^{**}$	$0,28 \pm 0,20$
Ganglions	$4,88 \pm 0,49^{**}$	$0,38 \pm 0,17$
Sang	$0,37 \pm 0,13$	$0,37 \pm 0,11$
Muscle	$0,13 \pm 0,07$	$0,10 \pm 0,02$
MDA-MB-231	$1,69 \pm 0,50^{***\#}$	$0,40 \pm 0,08$
HCC70	$0,89 \pm 0,27$	$0,60 \pm 0,23$

Tableau 17. Biodistribution de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ sur les souris porteuses de tumeurs HCC70 et MDA-MB-231. Une biodistribution par prélèvements d'organes a été réalisée 2 h après l'injection de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ (n=6) ou $^{99m}\text{Tc-Ctle}$ (n=6). ** $p < 0,01$ vs $^{99m}\text{Tc-Ctle}$; ## $p < 0,01$ vs HCC70.

3. Etudes *ex vivo* : Modèles de tumeurs greffées en sous-cutanée

Etant donné le rôle prépondérant de VCAM-1 dans les processus d'angiogenèse tumorale et les phénomènes inflammatoires, des amorces d'amplification spécifiques des ADNc VCAM-1 murin et humain ont été développées afin de discriminer l'expression de VCAM-1 murin (mVCAM-1) imputables à ces phénomènes de l'expression de VCAM-1 humain (hVCAM-1) attribuable aux cellules tumorales elles-mêmes (figure 123). Aucune expression de hVCAM-1 provenant des cellules tumorales n'est observée dans les tumeurs HCC70. En revanche, dans les 2 types de tumeurs, des expressions mesurables et comparables de mVCAM-1 ont pu être déterminées ($p=0,34$). L'expression de hVCAM-1 est prédominante dans les tumeurs MDA-MB-231, et cette expression est 4 fois plus importante que celle de mVCAM-1 ($3,9 \pm 0,7$ vs $1,0 \pm 0,1$, $p<0,001$).

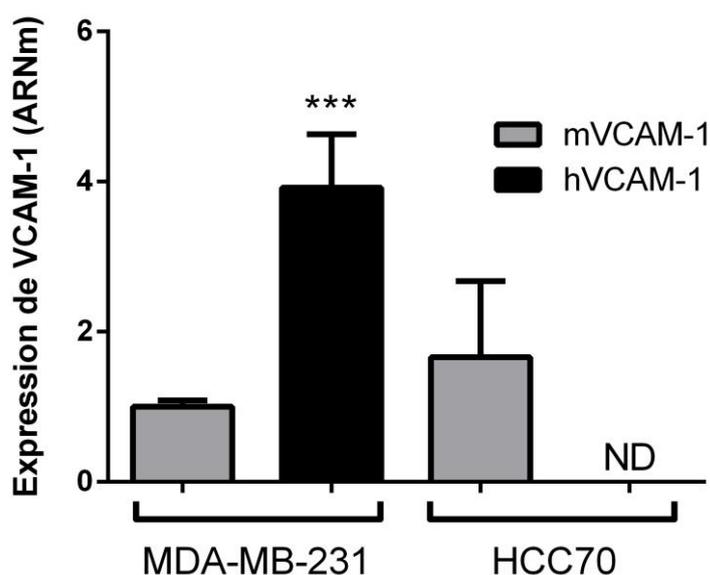


Figure 123. Détermination de l'expression de mVCAM-1 et hVCAM-1 des tumeurs HCC70 et MDA-MB-231 xéno greffées sur la souris BALB/c Nude par RT-qPCR. Les ARNm totaux des tumeurs HCC70 et MDA-MB-231 ont été extraits, rétrotranscrits et l'expression de hVCAM-1 et mVCAM-1 a été déterminée par RT-qPCR. ** $p<0,01$ vs MDA-MB-231 mVCAM-1.

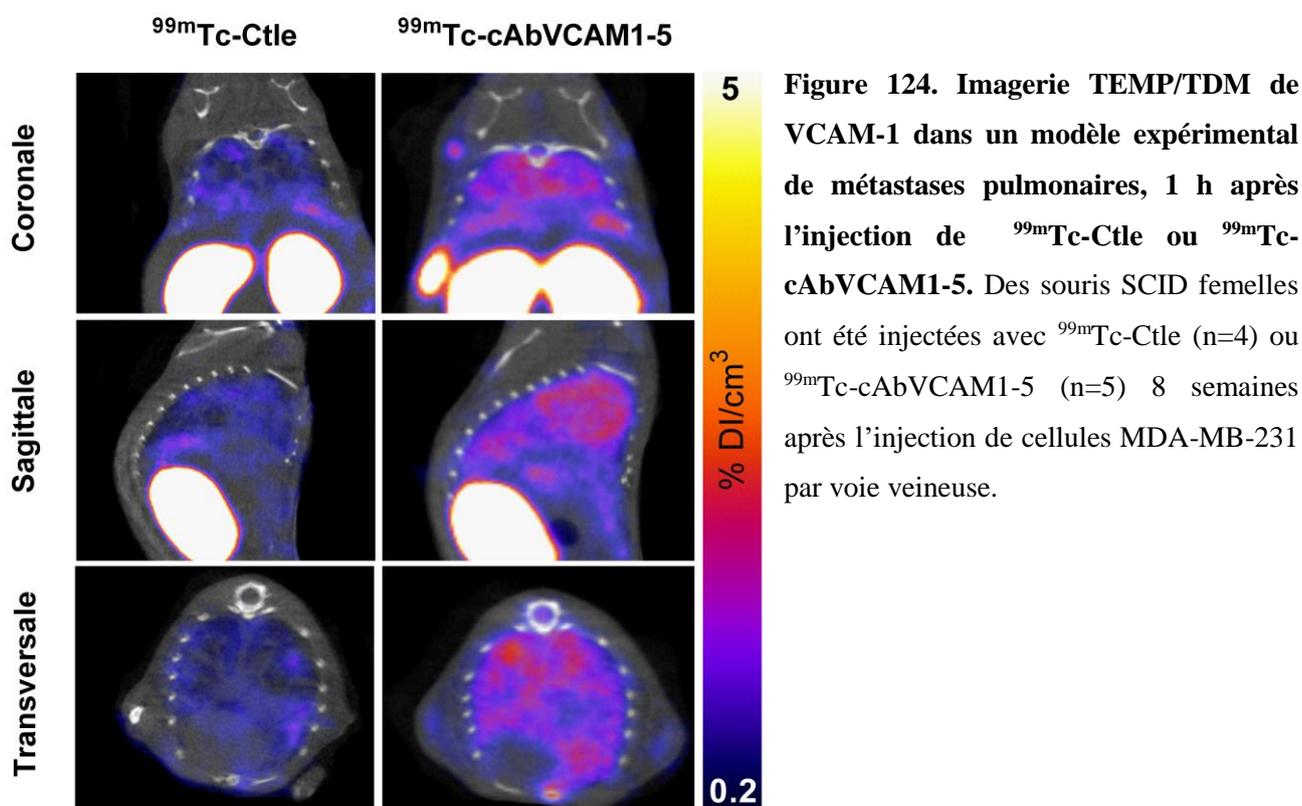
4. Etudes *in vivo* : Modèle de métastases pulmonaires

4.1 Analyse de la biodistribution de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5

Compte tenu de l'implication de VCAM-1 dans la dissémination métastatique, notamment au niveau du parenchyme pulmonaire, nous avons mesuré la fixation de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 en imagerie dans un modèle expérimental de lésions pulmonaires exprimant VCAM-1.

4.1.1 Acquisition TEMP/TDM et quantification

Les cellules MDA-MB-231 ont été injectées dans une veine latérale de la queue des souris SCID. Huit semaines plus tard, une imagerie TEMP/TDM a été réalisée au niveau des poumons (figure 124). Sur les différents axes, il est clairement visible que le traceur ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 se fixe de manière plus importante que le traceur ^{99m}Tc -Ctle au sein des poumons contenant les métastases MDA-MB-231.



La quantification de la fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ dans les poumons a été réalisée sur la base des images TEMP. $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ se fixe plus de 2,5 fois plus dans les poumons que $^{99m}\text{Tc-Ctle}$ ($1,7 \pm 0,5$ % DI/cm³ vs $0,7 \pm 0,1$ % DI/cm³, $p < 0,05$, figure 125).

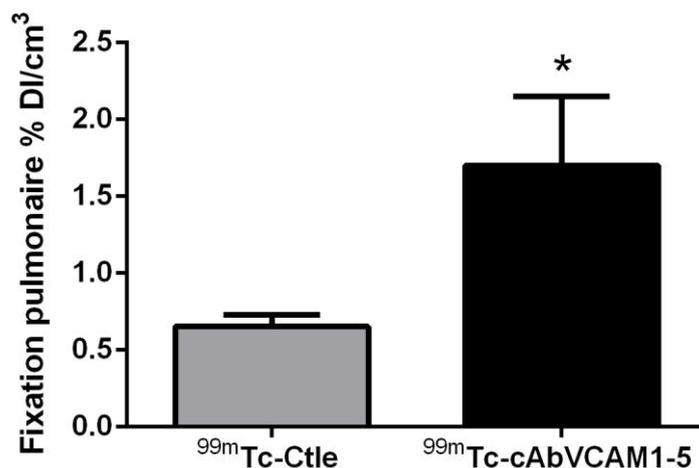


Figure 125. Quantification des fixations pulmonaires de $^{99m}\text{Tc-Ctle}$ (n=4) ou $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ (n=5) sur les images TEMP de souris SCID femelles porteuses de métastases pulmonaires. Une quantification totale des poumons a été réalisée sur ces images TEMP/TDM. * $p < 0,05$ vs $^{99m}\text{Tc-Ctle}$.

4.1.2 Biodistribution par prélèvements d'organes

La fixation pulmonaire des traceurs $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ et $^{99m}\text{Tc-Ctle}$ a également été déterminée *ex vivo*, par comptage des poumons dans leur intégralité. La fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ est 6 fois plus importante que celle de $^{99m}\text{Tc-Ctle}$ ($3,0 \pm 0,6$ vs $0,5 \pm 0,1$ % DI/g, $p < 0,05$) (figure 126).

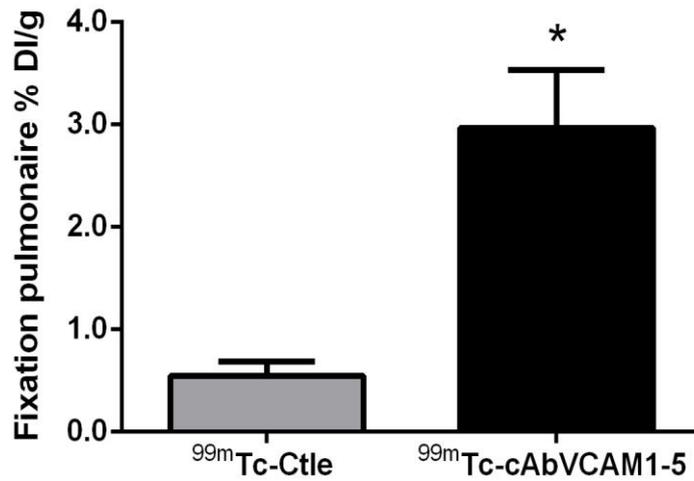


Figure 126. Quantification *ex vivo* des fixations pulmonaires de $^{99m}\text{Tc-Ctle}$ ou $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ de souris SCID femelles porteuses de métastases pulmonaires. Les poumons contenant les nodules MDA-MB-231 ont été pesés et comptés au compteur gamma Wizard² dans leur totalité. * $p < 0,05$ vs $^{99m}\text{Tc-Ctle}$.

5. Etudes *ex vivo* : Modèle expérimental de métastases pulmonaires

5.1 Autoradiographie

Etant donné que les nodules métastatiques sont disséminés dans le parenchyme pulmonaire et n'occupent qu'une partie du volume pulmonaire, des quantifications plus précises de la fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ au sein des foyers métastatiques ont été réalisées par autoradiographie (figure 127). Sur la partie gauche, la fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ au sein de nodules est clairement visible alors que celle de $^{99m}\text{Tc-Ctle}$ est très faible. La quantification a permis de confirmer que la fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ dans les nodules métastatiques était près de 4 fois plus élevée que celle de $^{99m}\text{Tc-Ctle}$ ($3,0 \pm 0,3$ vs $0,8 \pm 0,2$ % DI/g, $p < 0,05$).

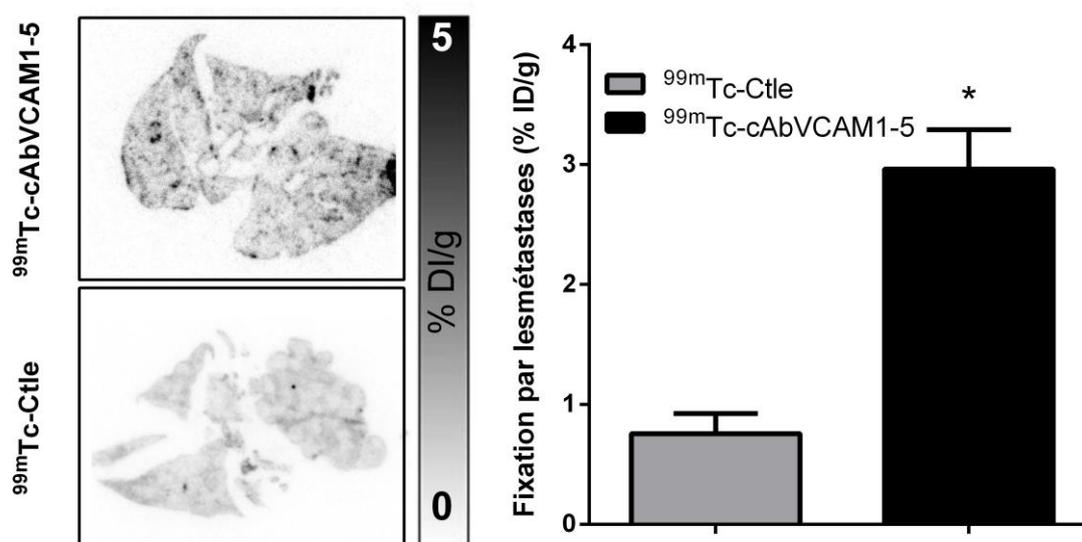


Figure 127. Analyse de la fixation de $^{99m}\text{Tc-Ctle}$ ou $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ au sein des foyers tumoraux pulmonaires en autoradiographie. La fixation des traceurs au sein des foyers métastatiques a été déterminée en traçant des zones d'intérêt sur les nodules définis sur la base des colorations HE. * $p < 0,05$ vs $^{99m}\text{Tc-Ctle}$.

5.2 Mesure de l'expression de VCAM-1 par RT-qPCR

De même que dans les modèles de xéno greffes sous-cutanée, l'expression de VCAM-1 peut être attribuée à la composante inflammatoire des tumeurs, et donc être d'origine murine, ou aux cellules tumorales elles-mêmes, et dans ce cas être d'origine humaine. Des RT-qPCR ont donc été réalisées pour discriminer mVCAM-1 de hVCAM-1. L'ARNm hVCAM-1 est près de 3 fois plus exprimé que mVCAM-1 ($2,8 \pm 1,1$ vs $1,0 \pm 0,1$, $p < 0,001$, figure 128). Ce résultat indique donc que la majeure partie de l'expression de VCAM-1 dans ce modèle provient des cellules tumorales elles-mêmes plutôt que du stroma tumoral.

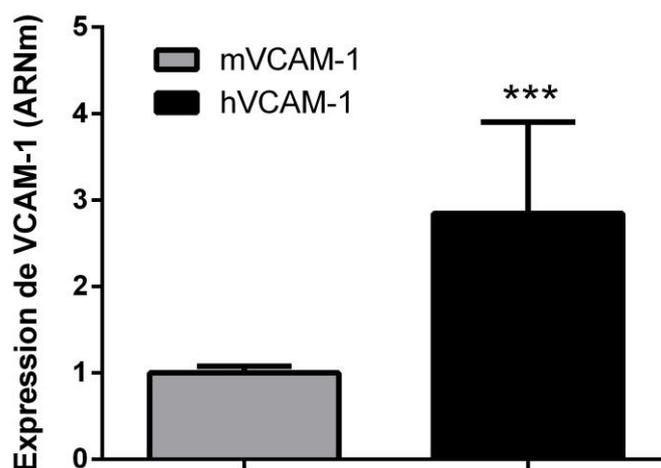


Figure 128. Détermination de l'expression de mVCAM-1 et hVCAM-1 des nodules métastatiques pulmonaires des cellules MDA-MB-231 par RT-qPCR. Les ARNm du tissu pulmonaire de souris SCID ont été extraits, rétrotranscrits et l'expression de VCAM-1 a été déterminée par RT-qPCR. * $p < 0,05$ vs MDA-MB-231 mVCAM-1.

Bilan des expérimentations *in vivo*

La seconde partie de ce travail a consisté en l'évaluation *in vivo* de ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 dans des modèles de cancer du sein triple négatif. **Nous avons pu montrer dans le modèle de xénogreffes en sous-cutanée que ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 se fixait près de 2 fois plus sur les tumeurs MDA-MB-231 exprimant VCAM-1 que sur les HCC70 n'exprimant pas cette cible.** Etant donné que la protéine VCAM-1 est exprimée par les cellules impliquées dans les phénomènes inflammatoires et les cellules endothéliales, nous avons déterminé *ex vivo* la part de l'ARN de VCAM-1 murin (mVCAM-1) et de l'ARN de VCAM-1 humain (hVCAM-1), pouvant respectivement être attribués d'une part à la composante inflammatoire et angiogénique et d'autre part à la composante tumorale. **Nous avons alors montré que la majorité de l'expression de VCAM-1 provenait des cellules tumorales elles-mêmes.** Ceci suggère que l'imagerie de VCAM-1 réalisée ici reflète l'expression de la protéine par les cellules tumorales plus que par les cellules du stroma tumoral.

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à l'imagerie de VCAM-1 dans un modèle expérimental de métastases pulmonaires. **L'imagerie des lésions pulmonaires a été réalisée avec succès.** Nous avons montré *ex-vivo* que les 2 formes de VCAM-1 étaient exprimées avec une prédominance de la forme hVCAM-1 au sein du poumon.

Discussion

Malgré les grandes avancées dans la compréhension de la biologie des cancers du sein et le développement de nouvelles approches thérapeutiques, ces cancers demeurent l'une des premières formes de cancers chez la femme (Ferlay et al, 2012). Si le taux de survie à 5 ans est proche de 100 % lorsque la pathologie est uniquement localisée au niveau du site primitif, le pronostic des patientes avec un cancer du sein métastatique est péjoratif, avec un taux de survie à 5 ans de 25 % (Mariotto et al., 2017). Malgré l'intensification des recherches pré-cliniques et cliniques, il existe toujours un besoin très important d'identification de cibles moléculaires et de thérapies spécifiques, nécessaires à l'amélioration de la prise en charge de ces patientes (Eckhardt et al., 2012). L'identification de gènes, de mécanismes impliqués dans les processus métastatiques, ainsi que le développement de traitements efficaces contre les cancers du sein métastatiques représentent d'immenses défis en recherche expérimentale et clinique.

Récemment, l'intérêt grandissant pour la compréhension des processus de progression tumorale a conduit à **l'identification de VCAM-1, comme un acteur clé de la croissance tumorale, de la dissémination métastatique et de l'angiogénèse** (Sharma et al., 2017). Dans le cancer du sein, il a en effet été montré que l'expression de VCAM-1 par les cellules tumorales était un facteur important de la colonisation pulmonaire et osseuse par celles-ci (Chen and Massague. 2012). De plus, il semble exister une étroite association entre l'expression de VCAM-1 et une survie réduite dans le cancer du sein (Maimaiti et al., 2016). En plus de ce type tumoral, l'expression de VCAM-1 a également été décrite dans les glioblastomes, les cancers gastriques, et ovariens, et cette expression est corrélée avec le grade clinico-pathologique des tumeurs (Ding et al., 2003 ; Liu et al., 2017 ; Huang et al., 2013).

Compte tenu du rôle que semble jouer VCAM-1 dans les processus métastatiques, il a été suggéré que des agents d'imagerie pourraient être employés pour (1) mieux comprendre le rôle biologique de VCAM-1 dans les processus métastatiques et (2) évaluer la valeur pronostique de VCAM-1 dans la maladie

métastatique en pratique clinique. Des traceurs ciblant cette protéine ont été développés ces dernières années et évalués pour l'imagerie de tumeurs (Zhang et al., 2018 ; Scalici et al., 2013). Au laboratoire, un ligand de VCAM-1, a récemment été développé, il s'agit d'un nanobody marqué au technétium 99m, ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5, actuellement en transfert clinique pour la détection des lésions athéromateuses (Broisat et al., 2012 ; Broisat et al., 2014 ; Dumas et al., 2017).

L'objectif de l'étude présentée ici a été de réaliser l'imagerie phénotypique des tumeurs du sein TN exprimant VCAM-1 à l'aide de cette molécule originale. Les deux lignées utilisées étaient les mêmes que pour la partie MSLN, à savoir les MDA-MB-231 et les HCC70, 2 lignées du sein TN.

Nous avons pu montrer *in vitro* que les cellules HCC70 n'expriment pas VCAM-1 que ce soit avec ou sans stimulation préalable par le TNF- α . En revanche, la lignée MDA-MB-231 exprime à la fois l'ARNm et la protéine VCAM-1 en conditions basales et cette expression augmente après stimulation au TNF- α . L'expression de la protéine VCAM-1 suit le profil d'expression de son ARNm. Monnier et al. avaient également montré *in vitro* que l'expression de l'ARNm et de la protéine VCAM-1 suivaient le même « pattern » (Monnier et al., 2012). Les résultats de cytométrie en flux ont permis de confirmer que cAbVCAM1-5 se fixait sur les cellules MDA-MB-231 et que cette expression augmentait après stimulation de ces cellules au TNF- α . Après le radiomarquage au ^{99m}Tc, ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 reste un ligand spécifique des cellules exprimant VCAM-1, comme cela a pu être montré *in vitro* par les études de compétition. Avec cet agent d'imagerie, les tumeurs MDA-MB-231 xénotransplantées en sous-cutanée sur des souris Nude ont été visualisées avec succès en imagerie TEMP-TDM, alors que de faibles fixations ont été observées par l'utilisation du ^{99m}Tc-Ctle ou dans les tumeurs HCC70 n'exprimant pas VCAM-1. Ceci suggère que le signal généré est préférentiellement attribuable aux cellules tumorales exprimant VCAM-1 elles-mêmes, plutôt qu'aux cellules endothéliales ou inflammatoires qui ont, elles, une origine murine. Ces résultats sont en adéquation avec les niveaux d'expression de mVCAM-1 et de hVCAM-1 déterminés par RT-qPCR : l'expression de hVCAM-1 est 4 fois supérieure à celle de mVCAM-1 dans ces expérimentations.

Etant donné l'implication de VCAM-1 dans la colonisation pulmonaire des cellules tumorales, une imagerie à l'aide de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ a ensuite été réalisée dans un modèle expérimental de métastases pulmonaires. La fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ dans ce modèle est près de 3 fois supérieure à celle de $^{99m}\text{Tc-Ctle}$ lorsqu'elle est déterminée sur la base des imageries TEMP-TDM, et près de 5 fois supérieure lorsqu'elle est déterminée par comptage *ex vivo* de la radioactivité. Cette différence peut probablement être attribuée au fait qu'en réalisant une quantification *in vivo* de la fixation pulmonaire, le volume d'intérêt contient un mélange d'air et de tissu, conduisant à une sous-estimation de la fixation du traceur par effet de volume partiel. Des quantifications plus précises déterminées en autoradiographie ont confirmé que la fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ est localisée au sein des nodules métastatiques. Enfin, les analyses *ex-vivo* de RT-qPCR ont permis de démontrer que l'expression de hVCAM-1, dans le poumon entier, était près de 3 fois supérieure à celle de mVCAM-1.

La fixation tumorale de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ est comparable à celle obtenue par Scalici et al. qui avaient utilisé un peptide ciblant VCAM-1 ($^{111}\text{In-tVCAM-4}$). Dans un modèle expérimental de cancer ovarien métastatique, la fixation de $^{111}\text{In-tVCAM-4}$ était d'environ 2 % DI/g 4 h après injection. Récemment, Zhang et al. par l'utilisation d'un scFv marqué à ^{68}Ga , ont obtenu des fixations de l'ordre de 5 % DI/g 3 h après injection, dans un modèle pré-clinique de mélanome. La fixation de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ est plus faible sur nos modèles expérimentaux, de l'ordre de 2 % DI/g 2 heures post-injection. Cependant, du fait de la clairance sanguine rapide du nanobody, les ratios tumeur/sang de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ sont meilleurs (5 à 2 h post-injection) que ceux du scFv qui est de 2 à 3 h post-injection. (Zhang X et al., 2018).

Conclusion de l'étude

Dans les deux modèles d'étude pré-cliniques de cancer du sein TN, l'imagerie TEMP de VCAM-1 a été réalisée avec succès. Le signal provenant de la tumeur reflète l'expression de hVCAM-1, c'est à dire de VCAM-1 exprimée par les cellules tumorales, plus que celle de mVCAM-1, exprimée par le stroma tumoral. Ces résultats suggèrent que $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ peut désormais être utilisé comme un outil pré-clinique pertinent pour évaluer le rôle de l'expression tumorale de VCAM-1 dans le processus de tumorigenèse et dans la dissémination de cellules néoplasiques. En clinique, si l'expression de VCAM-1 semble être corrélée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein, mais aussi dans le glioblastome et le cancer de l'ovaire, des études supplémentaires sont nécessaires pour investiguer le potentiel pronostique de $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ dans la maladie métastatique. Le traceur $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ va être transféré en clinique dans le cadre d'une phase I-IIa pour la détection des plaques d'athérome vulnérables. Nous pourrions donc envisager des protocoles cliniques pour évaluer son rôle pronostique dans le cancer du sein métastatique.

Discussion Générale

Discussion Générale

Avec près de 2 millions de nouveaux cas diagnostiqués en 2017, le cancer du sein demeure la première cause de cancer chez la femme. Deux tiers des patientes sont diagnostiquées avec un cancer du sein localisé au niveau de la glande mammaire et sans dissémination métastatique. En revanche, chez un tiers des patientes, il y a une atteinte loco-régionale (métastases ganglionnaires) ou présence de métastases à distance dès le diagnostic. Si dans le premier cas, la survie à 5 ans est supérieure à 85 %, la maladie métastatique la diminue drastiquement (SEER, National Cancer Institute, 2013). De plus, parmi les femmes initialement diagnostiquées sans métastases, plus de 20 % d'entre elles vont récidiver dans les 5 ans avec des métastases à distance (Group Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, 2005).

La prise en charge du cancer du sein se base en majeure partie sur les critères histologiques obtenus après une biopsie de la tumeur primaire. Pour cela, comme nous l'avons décrit, trois marqueurs sont systématiquement recherchés à partir des biopsies : les marqueurs des récepteurs hormonaux à l'œstrogène (ER) et à la progestérone (PR) ainsi que le marqueur HER2 (Perou, Sorlie, B. Eisen, et al., 2000; Sorlie et al., 2003). La prise en charge thérapeutique des patientes avec un cancer du sein métastatique dépend de plusieurs paramètres et notamment du phénotype de la tumeur primaire. Ainsi, les patientes sont traitées par hormonothérapie (anti-œstrogènes), thérapie ciblée (Trastuzumab : anti-HER2) et/ou chimiothérapie, sur la base des résultats de la biopsie de la tumeur primaire. Il existe cependant une hétérogénéité marquée dans les cancers et notamment dans les cancers du sein (Jamal-Hanjani et al., 2015). Comme nous l'avons vu, cette hétérogénéité existe à plusieurs niveaux : au sein de la tumeur, entre une tumeur et une métastase, et entre les différentes métastases. L'hétérogénéité entre la tumeur primaire et une lésion secondaire soulève la problématique de la prise en charge du cancer du sein métastatique basée sur l'histologie du site primitif. De ce fait pouvoir identifier le phénotype de chacune des lésions tumorales permettrait de traiter les patientes de façon beaucoup plus efficace, en fonction du phénotype des métastases. Pour déterminer le phénotype des métastases, une biopsie n'est

pas envisageable, d'autant plus dans le cadre d'une maladie multi-métastatique, et seules des techniques non invasives peuvent être envisagées. Dans ce contexte, la médecine nucléaire, basée sur une imagerie moléculaire de haute sensibilité, est particulièrement bien positionnée puisqu'elle permet de caractériser le phénotype d'une lésion de manière non invasive. Des explorations phénotypiques des lésions secondaires à un cancer du sein ont déjà été réalisées dans ce cadre-là, avec des agents ciblant la protéine HER2. Elles ont non seulement permis l'identification de lésions HER2+ chez des patientes diagnostiquées avec un cancer du sein HER2-, mais aussi un changement dans la prise en charge thérapeutique après cette réévaluation du statut HER2. Il est évident cependant que l'identification des trois seuls marqueurs, ciblant ER, PR, et HER2, est insuffisante et ne permettra qu'un phénotypage partiel des lésions.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons ciblé une nouvelle protéine, la mésothéline, pour l'approche marqueur compagnon. Il s'agit d'une glycoprotéine très faiblement exprimée par les tissus sains et surexprimée dans près de 45 % des tumeurs solides. De nombreuses thérapies la ciblant ont récemment été développées et sont actuellement en cours de transfert clinique. La plupart de ces thérapies ont notamment démontré d'importants effets anti-tumoraux. Le développement d'un marqueur compagnon de ces thérapies est nécessaire dans le but de permettre de sélectionner les patients éligibles à celles-ci. Le nanobody évalué au cours de ces travaux de thèse, $^{99m}\text{Tc-A1}$, pourrait être un outil très pertinent dans ce cadre-là. Nous avons pu montrer qu'il permettait de cibler spécifiquement les tumeurs exprimant la mésothéline tout en s'accumulant très peu dans les tissus sains. En effet, sa faible captation dans le tissu hépatique, le tissu osseux, les poumons ainsi que le cerveau, sites fréquents des métastases du cancer du sein, constituent des atouts importants de ce nanobody. De plus, les contrastes élevés entre la tumeur et les tissus environnants obtenus à temps court, dès 1 h après l'injection de $^{99m}\text{Tc-A1}$ en font un candidat très pertinent pour l'imagerie phénotypique. Sa faible taille lui confère également un pouvoir de pénétration important au sein du tissu tumoral, à la différence d'anticorps conventionnels qui ont notamment été évalués dans le cadre de l'imagerie des tumeurs exprimant la mésothéline.

^{99m}Tc-A1 est donc un agent prometteur pour l'imagerie phénotypique des tumeurs métastatiques exprimant la mésothéline et un potentiel marqueur compagnon des thérapies en développement.

En plus de pouvoir être un marqueur compagnon de thérapies en développement, ce nanobody pourrait également être un outil « théranostique ». L'approche théranostique constitue une nouvelle arme anti-cancer : elle consiste en la réalisation d'une imagerie phénotypique pour caractériser une lésion tumorale, à l'aide d'un agent radiomarqué avec un isotope radioactif adapté à l'imagerie TEMP ou TEP, puis en une thérapie ciblée avec le même agent mais radiomarqué avec un isotope fortement ionisant. Cette approche théranostique est actuellement en plein essor, et un agent théranostique ciblant le récepteur à la somatostatine vient notamment d'être approuvé pour le traitement des tumeurs neuroendocrines du tube digestif (⁶⁸Ga-DOTA-TATE et ¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE, Lutathera®). L'efficacité et l'innocuité du ¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE ont été évaluées lors de l'étude de phase III NETTER-1 chez 229 patients avec tumeurs neuroendocrines différenciés de l'intestin grêle métastatique ou localement avancé (Strosberg J et al., 2017). Le traitement par le ¹⁷⁷Lu-DOTA-TATE en combinaison avec le traitement de référence (analogue de la somatostatine seul : octréotide) a conduit à une survie sans progression de 65,2 % à 20 mois, alors qu'elle était de 10 % dans le groupe contrôle (patients traités avec l'octréotide seul). D'autres agents théranostiques ont d'ores et déjà été développés comme celui ciblant le récepteur Gastrine-Releasing Peptide Receptor, ou GRPR (NeoBomb1), et pourraient s'intégrer dans l'arsenal thérapeutique pour la prise en charge du cancer du sein métastatique (Dalm et al., 2017).

Les perspectives de ce travail concernant la mésothéline résident dans la modification du nanobody A1 pour réduire son accumulation dans le cortex rénal. Le nanobody modifié pourra ensuite être radiomarqué (1) au ⁶⁸Ga pour l'imagerie TEP et (2) au ¹⁷⁷Lu pour la radiothérapie interne vectorisée (RIV). Un avantage non négligeable de la RIV est une irradiation spécifique des cellules tumorales, limitant ainsi les effets secondaires sur les tissus sains. Différents radioisotopes peuvent être utilisés pour la thérapie comme les émetteurs de particules alpha ou

β^- . Le temps de parcours dans un tissu et l'énergie déposée sont dépendants du radioisotope. Dans le cadre du traitement d'une maladie métastatique, pouvant mettre en jeu des masses de faible taille, le ^{177}Lu (émetteur β^-) est un isotope pertinent. Il possède une pénétration tissulaire assez faible (< 2 mm), limitant l'irradiation des tissus sains, tout en déposant une énergie appropriée à la destruction des cellules tumorales. De plus, sa période de 6,7 jours est compatible à une utilisation en thérapie. Si l'hétérogénéité intra-tumorale peut être un frein au développement de thérapies ciblées, la RIV, à travers différents mécanismes, peut conduire à une destruction des cellules n'exprimant pas la cible. En effet, par un mécanisme « feu-croisé » (irradiation des cellules à proximité de celles exprimant la cible) et par l'effet Bystander, la RIV peut permettre une destruction locale de cellules tumorales n'exprimant pas le récepteur. Ainsi, dans une perspective thérapeutique, le développement de ^{177}Lu -A1 pourrait s'avérer un outil prometteur. Il pourrait être combiné aux thérapies ciblant la mésothéline actuellement en phase avancée d'essai clinique. Cette approche théranostique peut être adaptée à d'autres molécules. Au laboratoire, un ligand de l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ a été développé et marqué au ^{68}Ga et au ^{177}Lu . Au cours de l'évaluation pré-clinique de ce traceur (^{68}Ga -RAFT-RGD et ^{177}Lu -RAFT-RGD), le potentiel de cet agent à réaliser l'imagerie et la thérapie des tumeurs a été démontré. Cette molécule est actuellement en cours de transfert clinique pour l'imagerie phénotypique et le traitement des tumeurs du sein métastatiques, au CHU de Grenoble (CHU-Grenoble Alpes, CHUGA).

La deuxième partie de ces travaux de thèse a porté sur la protéine VCAM-1. Au cours de la dernière décennie et suite à l'intensification des recherches dans le champ de la compréhension des mécanismes de la progression tumorale, cette protéine a été identifiée comme jouant un rôle clé dans la dissémination métastatique du cancer du sein. Si son expression en oncologie est connue de longue date, via une expression sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et lymphatiques, ce n'est que plus récemment que l'expression de VCAM-1 par les cellules tumorales a été rapportée. En effet, l'expression de VCAM-1 par les cellules tumorales leur confère des propriétés essentielles dans la colonisation au niveau du parenchyme pulmonaire mais également du tissu osseux, si bien

qu'une inhibition de son expression diminue drastiquement la capacité de ces cellules à former des métastases dans ces organes. Le nanobody développé au laboratoire, $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$, a été évalué dans ces travaux de thèse pour son potentiel à cibler les tumeurs du sein exprimant VCAM-1. Nous avons pu montrer que cet agent permettait de faire l'imagerie des tumeurs exprimant VCAM-1, dans un modèle de xénogreffes en sous-cutanées et un modèle expérimental de métastases pulmonaires. Nous avons pu montrer par des analyses *ex vivo* que, sur les modèles utilisés, le signal détecté en imagerie provenait des cellules tumorales elles-mêmes plutôt que des cellules du stroma tumoral tel que l'endothélium vasculaire. $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ pourrait donc servir d'outil pour étudier le rôle précis de VCAM-1 au cours de la progression tumorale.

Au laboratoire, le $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ est actuellement en cours de transfert clinique pour l'imagerie des lésions athéromateuses. Une fois disponible, cet agent pourrait permettre de mener des investigations cliniques dans le cancer du sein. Il serait alors particulièrement intéressant d'étudier le potentiel pronostique de ce marqueur dans le cadre de la maladie métastatique. En effet, VCAM-1 semble jouer un rôle primordial dans la formation de macro-métastases cliniquement détectables. De plus, l'expression de VCAM-1 est associée à une rechute précoce dans le cancer du sein. Cependant la valeur pronostique de VCAM-1 dans la maladie métastatique n'a jamais été investiguée. **Ainsi, il sera intéressant d'évaluer avec $^{99m}\text{Tc-cAbVCAM1-5}$ le potentiel de l'imagerie de VCAM-1 comme une valeur pronostique dans le cancer du sein métastatique, auquel cas cet agent d'imagerie pourrait permettre de modifier la prise en charge des patientes.**

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Adusumilli, P. S., L. Cherkassky, J. Villena-Vargas, et al. Regional Delivery of Mesothelin-Targeted CAR T Cell Therapy Generates Potent and Long-Lasting CD4-Dependent Tumor Immunity. *Science Translational Medicine* 2014 5;6(261).

Aguirre-Ghiso, J.A. Models, Mechanisms and Clinical Evidence for Cancer Dormancy. *Nature Reviews Cancer* 2007 7(11): 834–846.

Alewine, C., L. Xiang, T. Yamori, et al. Efficacy of RG7787, a Next-Generation Mesothelin-Targeted Immunotoxin, against Triple-Negative Breast and Gastric Cancers. *Molecular Cancer Therapeutics* 2014 13(11): 2653–2661.

Alexiou, D., A.J Karayiannakis, K.N Syrigos, et al. Serum Levels of E-Selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in Colorectal Cancer Patients: Correlations with Clinicopathological Features, Patient Survival and Tumour Surgery. *European Journal of Cancer* 2001 37(18): 2392–2397.

Al-Hajj, M., M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison, and M. F. Clarke. Prospective Identification of Tumorigenic Breast Cancer Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003 100(7): 3983–3988.

Alitalo, K., S. Mohla, and E. Ruoslahti. Lymphangiogenesis and Cancer: Meeting Report. *Cancer Research* 2014 64: 9225–9229.

Allegra, A., I. Vanessa, G. Demetrio, et al, Nanobodies and Cancer: Current Status and New Perspectives. *Cancer Investigation*. 2018 36(10):1-17.

Allavena, R., S. Noy, M. Andrews, and N. Pullen. CNS Elevation of Vascular and Not Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecules in Patients with Multiple Sclerosis. *The American Journal of Pathology* 2010 176(2): 556–562.

Alluri, P., and L. A. Newman. Basal-Like and Triple-Negative Breast Cancers. *Surgical Oncology Clinics of North America* 2014 23(3): 567–577.

Almog, N. Molecular Mechanisms Underlying Tumor Dormancy. *Cancer Letters* 2010 294(2): 139–146.

Anders, C.K., and L. A. Carey. Biology, Metastatic Patterns, and Treatment of Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer* 2009 9: S73–S81.

Andre, F., N. Cabioglu, H. Assi, et al. Expression of Chemokine Receptors Predicts the Site of Metastatic Relapse in Patients with Axillary Node Positive Primary Breast Cancer. *Annals of Oncology* 2006 17(6): 945–951.

Andre, F., and C. C. Zielinski. Optimal Strategies for the Treatment of Metastatic Triple-Negative Breast Cancer with Currently Approved Agents. *Annals of Oncology* 2012 23(suppl 6): vi46–vi51.

Argani, P., C. Iacobuzio-Donahue, B. Ryu, et al. Mesothelin Is Overexpressed in the Vast

Majority of Ductal Adenocarcinomas of the Pancreas: Identification of a New Pancreatic Cancer Marker by Serial Analysis of Gene Expression (SAGE). *Clinical Cancer Research* 2001 7: 3862–3868.

Aslan, B., P. Monroig, M-C Hsu, et al. The ZNF304-Integrin Axis Protects against Anoikis in Cancer. *Nature Communications* 2015 6:7351

Assi, H. A., K. E. Khoury, H. Dbouk, et al. Epidemiology and Prognosis of Breast Cancer in Young Women. *Journal of Thoracic Disease* 2013 5(Suppl 1): S2.

Baba, K., S. Ishigami, T. Arigami, et al. Mesothelin Expression Correlates with Prolonged Patient Survival in Gastric Cancer: Mesothelin in Gastric Cancer. *Journal of Surgical Oncology* 2012 105(2): 195–199.

Baba, S., T. Isoda, Y. Maruoka, et al. Diagnostic and Prognostic Value of Pretreatment SUV in 18F-FDG/PET in Breast Cancer: Comparison with Apparent Diffusion Coefficient from Diffusion-Weighted MR Imaging. *Journal of Nuclear Medicine* 2014 55(5): 736–742.

Badowska-Kozakiewicz, A. M., and M. P. Budzik. Immunohistochemical Characteristics of Basal-like Breast Cancer. *Współczesna Onkologia* 2016 6: 436–443.

Banks, R., A. Gearing, I. Hemingway, et al. Circulating Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), E-Selectin and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Human Malignancies. *British Journal of Cancer* 1993 68(1): 122–124.

Bansal, C., S. Misra, V. Tiwari, et al. Comparative Evaluation of the Modified Scarff-Bloom-Richardson Grading System on Breast Carcinoma Aspirates and Histopathology. *CytoJournal* 2012 9(1): 4.

Banys, M., I. Gruber, N. Krawczyk, et al. Hematogenous and Lymphatic Tumor Cell Dissemination May Be Detected in Patients Diagnosed with Ductal Carcinoma in Situ of the Breast. *Breast Cancer Research and Treatment* 2012 131(3): 801–808.

Barreiro, O., M. Yáñez-Mó, J. M. Serrador, et al. Dynamic Interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with Moesin and Ezrin in a Novel Endothelial Docking Structure for Adherent Leukocytes. *The Journal of Cell Biology* 2002 157(7): 1233–1245.

Baskar, Rajamanickam, Jiawen Dai, Nei Wenlong, Richard Yeo, and Kheng-Wei Yeoh Biological Response of Cancer Cells to Radiation Treatment. *Frontiers in Molecular Biosciences* 1. 2014 1(24)

Battle, E., E. Sancho, C. Francí, et al. The Transcription Factor Snail Is a Repressor of E-Cadherin Gene Expression in Epithelial Tumour Cells. *Nature Cell Biology* 2000 2(2): 84–89.

Bayoglu, I. V., B. B. Kucukzeybek, Y. Kucukzeybek, et al. Prognostic Value of Mesothelin Expression in Patients with Triple Negative and HER2-Positive Breast Cancers. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2015 70: 190–195.

Beaber, E. F., K. E. Malone, M.-T. C. Tang, et al. Oral Contraceptives and Breast Cancer Risk

Overall and by Molecular Subtype Among Young Women. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2014 23(5): 755–764.

Beatson, G. T. On the Treatment of Inoperable Cases of Carcinoma of the Mamma: Suggestions for a New Method of Treatment. *Lancet* 1896 2: 104–107.

Beatty, G. L., A. R. Haas, M. V. Maus, et al. Mesothelin-Specific Chimeric Antigen Receptor mRNA-Engineered T Cells Induce Antitumor Activity in Solid Malignancies. *Cancer Immunology Research* 2014 2(2): 112–120.

Bera, T. K., and I. Pastan. Mesothelin Is Not Required for Normal Mouse Development or Reproduction. *Molecular and Cellular Biology* 2000 20(8): 2902–2906.

Bergers, G. and L. E. Benjamin. Tumorigenesis and the Angiogenic Switch: Angiogenesis. *Nature Reviews Cancer* 2003 3(6): 401–410.

Bertheau, P., J. Lehmann-Che, M. Varna, et al. P53 in Breast Cancer Subtypes and New Insights into Response to Chemotherapy. *The Breast* 2013 22: S27–S29.

Berx, G., and F. Van Roy. The E-Cadherin/Catenin Complex: An Important Gatekeeper in Breast Cancer Tumorigenesis and Malignant Progression. *Breast Cancer Research* 2001 3(5). al.,

Beyer, H. L., R. D. Geschwindt, C. L. Glover, et al., MESOMARKTM: A Potential Test for Malignant Pleural Mesothelioma. *Clinical Chemistry* 2007 53(4): 666–672.

Bharadwaj, U., M. Li, C. Chen, and Q. Yao Mesothelin-Induced Pancreatic Cancer Cell Proliferation Involves Alteration of Cyclin E via Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription Protein 3. *Molecular Cancer Research* 2008 6(11): 1755–1765.

Bharadwaj, U., C. Marin-Muller, M. Li, C. Chen, and Q. Yao Mesothelin Overexpression Promotes Autocrine IL-6/SIL-6R Trans-Signaling to Stimulate Pancreatic Cancer Cell Proliferation. *Carcinogenesis* 2011 32(7): 1013–1024.

Bharadwaj, U., C. Marin-Muller, M. Li, C. Chen, and Q. Yao. Mesothelin Confers Pancreatic Cancer Cell Resistance to TNF- α -Induced Apoptosis through Akt/PI3K/NF- κ B Activation and IL-6/Mcl-1 Overexpression. *Molecular Cancer* 2011 10(1): 106.

Bielenberg, D. R., and B. R. Zetter. The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis: *The Cancer Journal* 2015 21(4): 267–273.

Billaud, M. L'hétérogénéité intratumorale: Un obstacle darwinien à la médecine personnalisée ? (1). *médecine/sciences* 2012 28(12): 1116–1119.

Bines, J., H. Earl, A. C. Buzaid, and E. D. Saad Anthracyclines and Taxanes in the Neo/Adjuvant Treatment of Breast Cancer: Does the Sequence Matter? *Annals of Oncology* 2014 25(6): 1079–1085.

Borsig, L., R. Wong, R. O. Hynes, N. M. Varki, and A. Varki. Synergistic Effects of L- and P-

Selectin in Facilitating Tumor Metastasis Can Involve Non-Mucin Ligands and Implicate Leukocytes as Enhancers of Metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002 99(4): 2193–2198.

Botteri, E., D. Disalvatore, G. Curigliano, et al. Biopsy of Liver Metastasis for Women with Breast Cancer: Impact on Survival. *The Breast* 2012 21(3): 284–288.

Bozon-Petitprin, A., S. Bacot, A. S. Gauchez, et al. Targeted Radionuclide Therapy with RAFT-RGD Radiolabelled with ^{90}Y or ^{177}Lu in a Mouse Model of $\text{A}\alpha\text{v}\beta 3$ -Expressing Tumours. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2015 42(2): 252–263.

Braun, S., K. Pantel, P. Muller, et al. Cytokeratin-Positive Cells in the Bone Marrow and Survival of Patients with Stage I, II, or III Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine* 2000 342(8): 525–533.

Breiteneder-Geleff, S., A. Soleiman, H. Kowalski, et al. Angiosarcomas Express Mixed Endothelial Phenotypes of Blood and Lymphatic Capillaries. *The American Journal of Pathology* 1999 154(2): 385–394.

Briat, A., C. H. F. Wenk, M. Ahmadi, et al. Reduction of Renal Uptake of ^{111}In -DOTA-Labeled and A700-Labeled RAFT-RGD during Integrin $\text{A}\alpha\text{v}\beta 3$ Targeting Using Single Photon Emission Computed Tomography and Optical Imaging. *Cancer Science* 2012 103(6): 1105–1110.

Brockstedt, D. G., M. A. Giedlin, M. L. Leong, et al. Listeria-Based Cancer Vaccines That Segregate Immunogenicity from Toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004 101(38): 13832–13837.

Broisat, A. J. Toczek, L. S. Dumas, et al. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CAbVCAM1-5 Imaging Is a Sensitive and Reproducible Tool for the Detection of Inflamed Atherosclerotic Lesions in Mice. *Journal of Nuclear Medicine* 2014 55(10): 1678–1684.

Broisat, A., S. Hernot, J. Toczek, et al. Nanobodies Targeting Mouse/Human VCAM1 for the Nuclear Imaging of Atherosclerotic Lesions. *Circulation Research* 2012 110(7): 927–937.

Brooks, P. C. Role of Integrins in Angiogenesis. *European Journal of Cancer* 1996 32A(14): 2423–2429.

Buck, A., H. Schirrmeister, T. Kühn, et al. FDG Uptake in Breast Cancer: Correlation with Biological and Clinical Prognostic Parameters. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2002 29(10): 1317–1323.

Bussemakers, M.J.G., and J.A. Schalken. The Role of Cell Adhesion Molecules and Proteases in Tumor Invasion and Metastasis. *World Journal of Urology* 1996 14(3):151-156

Butler, T. P, and P. M. Gullino. Quantitation of Cell Shedding into Efferent Blood of Mammary. *Cancer Research* 1975 35: 6.

- Byrne, J.G, A. Ghellal, J. Iddon, AD. Blann, et al. Serum Soluble vascular cell adhesion molecule-1: role as a surrogate marker of angiogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* 2000 (92)16:1329-1336
- Callahan, R., and S. Hurvitz. HER2-Positive Breast Cancer: Current Management of Early, Advanced, and Recurrent Disease. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology* 2011 23(1): 37.
- Calmels, B. Immunologie et cancer: mécanismes d'échappement tumoraux. *Oncologie* 2004 6(8): 525–533.
- Cardones, A. R., T. Murakami, and S. T. Hwang. CXCR4 Enhances Adhesion of B16 Tumor Cells to Endothelial Cells in Vitro and in Vivo via α_1 1 Integrin. *Cancer Research* 2003 63: 6751–6757.
- Carey, L. A., E. C. Dees, L. Sawyer, et al. The Triple Negative Paradox: Primary Tumor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes. *Clinical Cancer Research* 2007 13(8): 2329–2334.
- Carpenito, C., M. C. Milone, R. Hassan, et al. Control of Large, Established Tumor Xenografts with Genetically Retargeted Human T Cells Containing CD28 and CD137 Domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009 106(9): 3360–3365.
- Cavallaro, U., and G. Christofori. Cell Adhesion in Tumor Invasion and Metastasis: Loss of the Glue Is Not Enough. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 2001 1552(1): 39–45.
- Chakravarty, R., S. Goel, and W. Cai. Nanobody: The “Magic Bullet” for Molecular Imaging? *Theranostics* 2014 4(4): 386–398.
- Chambers, A. F., A. C. Groom, and I. C. MacDonald. Dissemination and Growth of Cancer Cells in Metastatic Sites: Metastasis. *Nature Reviews Cancer* 2002 2(8): 563–572.
- Chang, K., and I. Pastan. Molecular Cloning of Mesothelin, a Differentiation Antigen Present on Mesothelium, Mesotheliomas, and Ovarian Cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996 93(1): 136–140.
- Chang, K., I. Pastan, and C. Mark. Willingha Isolation and Characterization of a Monoclonal Antibody, K1, Reactive with Ovarian Cancers and Normal Mesothelium. *International Journal of Cancer* 1992 50(3): 373–381.
- Chang, M-C., C-A. Chen, P-J. Chen, et al. Mesothelin Enhances Invasion of Ovarian Cancer by Inducing MMP-7 through MAPK/ERK and JNK Pathways. *Biochemical Journal* 2012 442(2): 293–302.
- Cheang, M. C. U., S. K. Chia, D. Voduc, et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 2009 101(10): 736–750.

Chen, Q., and J. Massague. Molecular Pathways: VCAM-1 as a Potential Therapeutic Target in Metastasis. *Clinical Cancer Research* 2012 18(20): 5520–5525.

Chen, Q., X. H.-F. Zhang, and J. Massagué. Macrophage Binding to Receptor VCAM-1 Transmits Survival Signals in Breast Cancer Cells That Invade the Lungs. *Cancer Cell* 2011 20(4): 538–549.

Chen, S-H, W-C. Hung, P. Wang, C. Paul, and K. Konstantopoulos. Mesothelin Binding to CA125/MUC16 Promotes Pancreatic Cancer Cell Motility and Invasion via MMP-7 Activation. *Scientific Reports* 2013 3(1).

Chen, W. Y., B. Rosner, S. E. Hankinson, G. A. Colditz, and W. C. Willett. Moderate Alcohol Consumption During Adult Life, Drinking Patterns, and Breast Cancer Risk. *JAMA* 2011 306(17): 1884.

Cheng, W-F., C-Y. Huang, M-C. Chang, et al. High Mesothelin Correlates with Chemoresistance and Poor Survival in Epithelial Ovarian Carcinoma. *British Journal of Cancer* 2009 100(7): 1144–1153.

Chew, H. K. Adjuvant Therapy for Breast Cancer: Who Should Get What? *Medicine Cabinet* 2001 (174): 284–287.

Chitadze, G., J. Bhat, M. Lettau, O. Janssen, and D. Kabelitz. Generation of Soluble NKG2D Ligands: Proteolytic Cleavage, Exosome Secretion and Functional Implications. *Scandinavian Journal of Immunology* 2013 78(2): 120–129.

Chowdhury, P. S., J. L. Viner, R. Beers, and I. Pastan. Isolation of a High-Affinity Stable Single-Chain Fv Specific for Mesothelin from DNA-Immunized Mice by Phage Display and Construction of a Recombinant Immunotoxin with Anti-Tumor Activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998 95(2): 669–674.

Cook-Mills, J. M., M. E. Marchese, and H. Abdala-Valencia. Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression and Signaling during Disease: Regulation by Reactive Oxygen Species and Antioxidants. *Antioxidants & Redox Signaling* 2011 15(6): 1607–1638.

Coulson, A, A Levy, and M Gossell-Williams. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy: Mechanisms, Successes and Limitations. *West Indian Medical Journal.*, 2014 63(6):650-654.

Coupland, L. A., B. H. Chong, and C. R. Parish. Platelets and P-Selectin Control Tumor Cell Metastasis in an Organ-Specific Manner and Independently of NK Cells. *Cancer Research* 2012 72(18): 4662–4671.

Creaney, J., I. van Bruggen, M. Hof, et al. Combined CA125 and Mesothelin Levels for the Diagnosis of Malignant Mesothelioma. *Chest* 2007 132(4): 1239–1246.

Crown, J., J. O’Shaughnessy, and G. Gullo. Emerging Targeted Therapies in Triple-Negative Breast Cancer. *Annals of Oncology* 2012 23(suppl 6): vi56–vi65.

Curigliano, G., V. Bagnardi, G. Viale, et al. Should Liver Metastases of Breast Cancer Be Biopsied to Improve Treatment Choice? *Annals of Oncology* 2011 22(10): 2227–2233.

Cybulsky, M. I., K. Iiyama, H. Li, et al. But Not ICAM-1, in Early Atherosclerosis. *The Journal of Clinical Investigation* 2001 107(10): 8.

Dagogo-Jack, I., and A. T. Shaw. Tumour Heterogeneity and Resistance to Cancer Therapies. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2017 15(2): 81–94.

Dainty, L. A., J. I. Risinger, C. Morrison, et al. Overexpression of Folate Binding Protein and Mesothelin Are Associated with Uterine Serous Carcinoma. *Gynecologic Oncology* 2007 105(3): 563–570.

Dalm, S. U., I. L. Bakker, E. de Blois, et al. $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$ -NeoBOMB1, a Novel Radiolabeled GRPR Antagonist for Theranostic Use in Oncology. *Journal of Nuclear Medicine* 2017 58(2): 293–299.

Daly, M. J. Death by Protein Damage in Irradiated Cells. *DNA Repair* 2012 11(1): 12–21.

De Genst, E., D. Saerens, S. Muyldermans, and K. Conrath. Antibody Repertoire Development in Camelids. *Developmental & Comparative Immunology* 2006 30(1–2): 187–198.

De Santi, C., S. Vencken, J. Blake, et al. Identification of MiR-21-5p as a Functional Regulator of Mesothelin Expression Using MicroRNA Capture Affinity Coupled with Next Generation Sequencing. Fabio Martelli, ed. *PLOS ONE* 2017 12(1): e0170999.

De Vos, J., N. Devoogdt, T. Lahoutte, and S. Muyldermans. Camelid Single-Domain Antibody-Fragment Engineering for (Pre)Clinical *in Vivo* Molecular Imaging Applications: Adjusting the Bullet to Its Target. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2013 13(8): 1149–1160.

Deem, T. L. Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) Activation of Endothelial Cell Matrix Metalloproteinases: Role of Reactive Oxygen Species. *Blood* 2004 104(8): 2385–2393.

Dehdashti, F., R. Laforest, F. Gao, et al., Assessment of Progesterone Receptors in Breast Carcinoma by PET with 21-18F-Fluoro-16,17-[(R)-(1'-Furylmethylidene)Dioxy]-19-Norpregn-4-Ene-3,20-Dione. *Journal of Nuclear Medicine* 2012 53(3): 363–370.

Dent, R., M. Trudeau, K. I. Pritchard, et al., Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clinical Cancer Research* 2007 13(15): 4429–4434.

Desgrosellier, J. S., and D. A. Cheresh. Integrins in Cancer: Biological Implications and Therapeutic Opportunities. *Nature Reviews Cancer* 2010 10(1): 9–22.

D'Huyvetter, M., C. Vincke, C. Xavier, et al. Targeted Radionuclide Therapy with A ^{177}Lu -Labeled Anti-HER2 Nanobody. *Theranostics* 2014 4(7): 708–720.

Diéras, V., P. Tresca, C. Le Tourneau, A. V. Salomon, and J. Y. Pierga. Cancers Du Sein Triple Négatifs. *La Lettre Du Cancérologue* 2010 19(6): 349–355.

Dijkers, E. C.F., J. G.W. Kosterink, A. P. Rademaker, et al. Development and Characterization of Clinical-Grade 89Zr-Trastuzumab for HER2/Neu ImmunoPET Imaging. *Journal of Nuclear Medicine* 2009 50(6): 974–981.

Ding, Y-B, G-Y Chen, J-G Xia, et al. Association of VCAM-1 Overexpression with Oncogenesis, Tumor Angiogenesis and Metastasis of Gastric Carcinoma. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 2003 9(7): 1409.

Dirkx, A. E. M., V. V. T. Heijnen, and J. C. A. Bouma-ter. Tumor Angiogenesis Modulates Leukocyte-Vessel Wall Interactions in Vivo by Reducing Endothelial Adhesion Molecule Expression. *Cancer Research* 2003 63:9 (2322–2329).

Dogan, B. E., and L. W. Turnbull. Imaging of Triple-Negative Breast Cancer. *Annals of Oncology* 2012 23(suppl 6): vi23–vi29.

Dumas, L. S., F. Briand, R. Clerc, et al. Evaluation of Antiatherogenic Properties of Ezetimibe Using ³H-Labeled Low-Density-Lipoprotein Cholesterol and ^{99m}Tc-CAbVCAM1–5 SPECT in ApoE^{-/-} Mice Fed the Paigen Diet. *Journal of Nuclear Medicine* 2017 58(7): 1088–1093.

DuPage, M., C. Mazumdar, L. M. Schmidt, A. F. Cheung, and T. Jacks. Expression of Tumour-Specific Antigens Underlies Cancer Immunoediting. *Nature* 2012 482(7385): 405–409.

Dusek, R. L., and L. D. Attardi. Desmosomes: New Perpetrators in Tumour Suppression. *Nature Reviews Cancer* 2011 11(5): 317–323.

Dutta, P., F. Felix Hoyer, L. S. Grigoryeva, et al. Macrophages Retain Hematopoietic Stem Cells in the Spleen via VCAM-1. *The Journal of Experimental Medicine* 2015 212(4): 497–512.

Eckhardt, B. L., P. A. Francis, B. S. Parker, and R. L. Anderson. Strategies for the Discovery and Development of Therapies for Metastatic Breast Cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* 2012 11(6): 479–497.

Einama, T., S. Homma, H. Kamachi, et al. Luminal Membrane Expression of Mesothelin Is a Prominent Poor Prognostic Factor for Gastric Cancer. *British Journal of Cancer* 2012 107(1): 137–142.

Einama, T., H. Kamachi, H. Nishihara, et al. Co-Expression of Mesothelin and CA125 Correlates With Unfavorable Patient Outcome in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: *Pancreas* 2011 40(8): 1276–1282.

Eric, L., C. J. Yeo, K. D. Lillemoe, et al. A Lethally Irradiated Allogeneic Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor-Secreting Tumor Vaccine for Pancreatic Adenocarcinoma: A Phase II Trial of Safety, Efficacy, and Immune Activation. *Annals of Surgery* 2011 253(2): 328–335.

Eroles, P., Ana B., J. A. Pérez-Fidalgo, and A. Lluch. Molecular Biology in Breast Cancer: Intrinsic Subtypes and Signaling Pathways. *Cancer Treatment Reviews* 2012 38(6): 698–707.

- Eyles, J., A-L. Puaux, X. Wang, et al. Tumor Cells Disseminate Early, but Immunosurveillance Limits Metastatic Outgrowth, in a Mouse Model of Melanoma. *Journal of Clinical Investigation* 2010 120(6): 2030–2039.
- Fan, D., S. Yano, H. Shinohara, et al. Targeted Therapy against Human Lung Cancer in Nude Mice by High-Affinity Recombinant Antimesothelin Single-Chain Fv Immunotoxin. *Molecular Cancer Therapeutics* 2002 1:7(595–600).
- Fehon, R. G., A. I. McClatchey, and A. Bretscher. Organizing the Cell Cortex: The Role of ERM Proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2010 11(4): 276–287.
- Feng, Y., W. Wang, J. Hu, et al. Expression of VEGF-C and VEGF-D as Significant Markers for Assessment of Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis in Non-Small Cell Lung Cancer. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 2010 293(5): 802–812.
- Ferjancic, S., A. M. Gil-Bernabe, S. A. Hill, et al. VCAM-1 and VAP-1 Recruit Myeloid Cells That Promote Pulmonary Metastasis in Mice. *Blood* 2013 121(16): 3289–3297.
- Ferrara, N., K. J. Hillan, and W. Novotny. Bevacizumab (Avastin), a Humanized Anti-VEGF Monoclonal Antibody for Cancer Therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005 333(2): 328–335.
- Fidler, I. J. The Pathogenesis of Cancer Metastasis: The 'seed and Soil' hypothesis Revisited. *Nature Reviews Cancer* 2003 3(6): 453.
- Ford, D., D. F. Easton, D. T. Bishop, S. A. Narod, and D. E. Goldgar. Risks of Cancer in BRCA1-Mutation Carriers. *The Lancet* 1994 343(8899): 692–695.
- Foukakis, T., G. Astrom, L. Lindstrom, T. Hatschek, and J. Bergh When to Order a Biopsy to Characterise a Metastatic Relapse in Breast Cancer. *Annals of Oncology* 2012 23(suppl 10): x349–x353.
- Foulkes, W. D. Germline BRCA1 Mutations and a Basal Epithelial Phenotype in Breast Cancer. *CancerSpectrum Knowledge Environment* 2003 95(19): 1482–1485.
- Frierson, H. F, C. A. Moskaluk, Steven M Powell, et al. Large-Scale Molecular and Tissue Microarray Analysis of Mesothelin Expression in Common Human Carcinomas. *Human Pathology* 2003 34(6): 605–609.
- Fulawka, L., P. Donizy, and A. Halon. Cancer Stem Cells – the Current Status of an Old Concept: Literature Review and Clinical Approaches. *Biological Research* 2014 47(1): 66.
- Furlow, P. W., S. Zhang, T. D. Soong, et al. Mechanosensitive Pannexin-1 Channels Mediate Microvascular Metastatic Cell Survival. *Nature Cell Biology* 2015 17(7): 943–952.
- Fuster, V., P. R. Moreno, Z. A. Fayad, R. Corti, and J. J. Badimon. Atherothrombosis and High-Risk Plaque. *Journal of the American College of Cardiology* 2005 46(6): 937–954.

Galaine, J., and C. Borg. Utilisation de lymphocytes T génétiquement modifiés avec un récepteur antigénique chimérique (CAR) pour la thérapie cellulaire des cancers 2017 3: 11.

Garmy-Susini, B., C. J. Avraamides, J. S. Desgrosellier, et al. PI3K Activates Integrin $\alpha 4 \beta 1$ to Establish a Metastatic Niche in Lymph Nodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013 110(22): 9042–9047.

Garton, K. J., P. J. Gough, J. Philalay, et al. Stimulated Shedding of Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) Is Mediated by Tumor Necrosis Factor- α -Converting Enzyme (ADAM 17). *Journal of Biological Chemistry* 2003 278(39): 37459–37464.

Gasparini, G., P.C. Brooks, E. Biganzoli, P.B. Vermeulen et al. Vascular integrin $\alpha(v)\beta 3$: a new prognostic indicator in breast cancer. *Clinical Cancer Research* 1998 4(11):2625-2634.

Gay, L. J., and B. Felding-Habermann. Contribution of Platelets to Tumour Metastasis. *Nature Reviews Cancer* 2011 11(2): 123–134.

Geary, S.M., C.D Lemke, D. M. Lubaroff, A.K. Salem. Proposed mechanisms of action for prostate cancer vaccines. *Nature Review Urology* 2013 10(3):149-160.

Gil-Bernabé, A. M., S. Lucotti, and R. J. Muschel. Coagulation and Metastasis: What Does the Experimental Literature Tell Us? *British Journal of Haematology* 2013 162(4): 433–441.

Golfier, S., C. Kopitz, A. Kahnert, et al. Anetumab Ravtansine: A Novel Mesothelin-Targeting Antibody-Drug Conjugate Cures Tumors with Heterogeneous Target Expression Favored by Bystander Effect. *Molecular Cancer Therapeutics* 2014 13(6): 1537–1548.

Gomis, R. R., and S. Gawrzak. Tumor Cell Dormancy. *Molecular Oncology* 2017 11(1): 62–78.

Grabinski, N., K. Bartkowiak, K. Grupp, et al. Distinct Functional Roles of Akt Isoforms for Proliferation, Survival, Migration and EGF-Mediated Signalling in Lung Cancer Derived Disseminated Tumor Cells. *Cellular Signalling* 2011 23(12): 1952–1960.

Griffioen, A. W., C. A. Damen, S. Martinotti, G. H. Blijham, and G. Groenewegen. Endothelial Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression Is Suppressed in Human Malignancies: The Role of Angiogenic Factors'. *Cancer Research* 1996 56: 1111–1117.

Grigoriu, B.-D., A. Scherpereel, P. Devos, et al. Utility of Osteopontin and Serum Mesothelin in Malignant Pleural Mesothelioma Diagnosis and Prognosis Assessment. *Clinical Cancer Research* 2007 13(10): 2928–2935.

Grigoriu, B.-D, Chahine B, Vachani Anil, et al. Kinetics of Soluble Mesothelin in Patients with Malignant Pleural Mesothelioma during Treatment. 2009 *Am J Respir Crit Care Med* 179(10):950-954.

Groheux, D., J-L. Moretti, G. Baillet, et al. Effect of ^{18}F -FDG PET/CT Imaging in Patients With Clinical Stage II and III Breast Cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 2008 71(3): 695–704.

Gross, G., T. Waks, and Z. Eshhar. Expression of Immunoglobulin-T-Cell Receptor Chimeric Molecules as Functional Receptors with Antibody-Type Specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1989 86(24): 10024–10028.

Group Early Breast Cancer Trialists' Collaborative. Effects of Chemotherapy and Hormonal Therapy for Early Breast Cancer on Recurrence and 15-Year Survival: An Overview of the Randomised Trials. *The Lancet* 2005 365(9472): 1687–1717.

Grünert, S., M. Jechlinger, and H. Beug. Diverse Cellular and Molecular Mechanisms Contribute to Epithelial Plasticity and Metastasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2003 4(8): 657–665.

Guaiquil, V., S. Swendeman, T. Yoshida, et al. ADAM9 Is Involved in Pathological Retinal Neovascularization. *Molecular and Cellular Biology* 2009 29(10): 2694–2703.

Guarneri, V., S. Giovannelli, G. Ficarra, et al. Comparison of HER-2 and Hormone Receptor Expression in Primary Breast Cancers and Asynchronous Paired Metastases: Impact on Patient Management. *The Oncologist* 2008 13(8): 838–844.

Gubbels, J. A. A, J. Belisle, M. Onda, et al. Mesothelin-MUC16 Binding Is a High Affinity, N-Glycan Dependent Interaction That Facilitates Peritoneal Metastasis of Ovarian Tumors. *Molecular Cancer* 2006 5:50.

Guo, P., Q. Fang, H-Q. Tao, et al. Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor by MCF-7 Breast Cancer Cells Promotes Estrogen-Independent Tumor Growth in Vivo. *Cancer Research* 2003 63: 4684–4691.

Guo, W., and F. G. Giancotti. Integrin Signalling during Tumour Progression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2004 5(10): 816–826.

Gupta, G. P., and J. Massagué. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell* 2006 127(4): 679–695.

Gurtner, G. C., V. Davis, H. Li, et al. Targeted Disruption of the Murine VCAM1 Gene: Essential Role of VCAM-1 in Chorioallantoic Fusion and Placentation. *Genes & Development* 1995 9(1): 1–14.

Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993 3;363(6428):446-8.

Hanahan, D., and R. A. Weinberg. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011 144(5): 646–674.

Hartmann, L. C., D. C. Radisky, M. H. Frost, et al. Understanding the Premalignant Potential of Atypical Hyperplasia through Its Natural History: A Longitudinal Cohort Study. *Cancer Prevention Research* 2014 7(2): 211–217.

Hassan, R. Tumor-Directed Radiation and the Immunotoxin SS1P in the Treatment of Mesothelin-Expressing Tumor Xenografts. *Clinical Cancer Research* 2006 12(16): 4983–4988.

Hassan, R., C. Alewine, and I. Pastan New Life for Immunotoxin Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research* 2016 22(5): 1055–1058.

Hassan, R., S. Bullock, A. Premkumar, et al. Phase I Study of SS1P, a Recombinant Anti-Mesothelin Immunotoxin Given as a Bolus I.V. Infusion to Patients with Mesothelin-Expressing Mesothelioma, Ovarian, and Pancreatic Cancers. *Clinical Cancer Research* 2007 13(17): 5144–5149.

Hassan, R., W. Ebel, E. L. Routhier, et al. Preclinical Evaluation of MORAb-009, a Chimeric Antibody Targeting Tumor-Associated Mesothelin. *Cancer Immunity* 2007 7: 20.

Hassan, R., Z. G. Laszik, M. Lerner, et al. Mesothelin Is Overexpressed in Pancreaticobiliary Adenocarcinomas but Not in Normal Pancreas and Chronic Pancreatitis. *American Journal of Clinical Pathology* 2005 124(6): 838–845.

Hassan, R., M. R. Lerner, D. Benbrook, et al. Antitumor Activity of SS (DsFv) PE38 and SS1 (DsFv) PE38, Recombinant Antimesothelin Immunotoxins against Human Gynecologic Cancers Grown in Organotypic Culture in Vitro. *Clinical Cancer Research* 2002 8(11): 3520–3526.

Hassan, R., C. Schweizer, K. F. Lu, et al. Inhibition of Mesothelin–CA-125 Interaction in Patients with Mesothelioma by the Anti-Mesothelin Monoclonal Antibody MORAb-009: Implications for Cancer Therapy. *Lung Cancer* 2010 68(3): 455–459.

Hassan, R., E. Sharon, A. Thomas, et al. Phase 1 Study of the Antimesothelin Immunotoxin SS1P in Combination with Pemetrexed and Cisplatin for Front-Line Therapy of Pleural Mesothelioma and Correlation of Tumor Response with Serum Mesothelin, Megakaryocyte Potentiating Factor, and Cancer Antigen: SS1P Plus Chemotherapy for Mesothelioma. *Cancer* 2014 120(21): 3311–3319.

Hassan, R., A. Thomas, C. Alewine, et al. Mesothelin Immunotherapy for Cancer: Ready for Prime Time? *Journal of Clinical Oncology* 2016 34(34): 4171–4179.

Hassan, R., C. Wu, M. W. Brechbiel, et al. ¹¹¹Indium-Labeled Monoclonal Antibody K1: Biodistribution Study in Nude Mice Bearing a Human Carcinoma Xenograft Expressing Mesothelin. *International Journal of Cancer* 1999 80(4): 559–563.

Haug, A., C. J. Auernhammer, B. Wängler, et al. Intraindividual Comparison of ⁶⁸Ga-DOTA-TATE and ¹⁸F-DOPA PET in Patients with Well-Differentiated Metastatic Neuroendocrine Tumours. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2009 36(5): 765–770.

Häuselmann, I., M. Roblek, D. Protsyuk, et al. Monocyte Induction of E-Selectin–Mediated Endothelial Activation Releases VE-Cadherin Junctions to Promote Tumor Cell Extravasation in the Metastasis Cascade. *Cancer Research* 2016 76(18): 5302–5312.

He, X., L. Wang, H. Riedel, et al. Mesothelin Promotes Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Tumorigenicity of Human Lung Cancer and Mesothelioma Cells. *Molecular Cancer* 2017 16(1).al.,

Heimann, R., F. Lan, R. McBride, and S. Hellman. Separating Favorable from Unfavorable Prognostic Markers in Breast Cancer: The Role of E-Cadherin. *Cancer Research* 2000 60: 298–304.

Hellstrom, I. Mesothelin Variant 1 Is Released from Tumor Cells as a Diagnostic Marker. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2006 15(5): 1014–1020.

Hino. Suppression of Cell Death by the Secretory Form of N-Terminal ERC/Mesothelin. *International Journal of Molecular Medicine* 2010 26(2).

Ho, M., T. K. Bera, M. C. Willingham, et al. Mesothelin Expression in Human Lung Cancer. *Clinical Cancer Research* 2007 13(5): 1571–1575.

Ho, M., R. Hassan, J. Zhang, et al. Humoral Immune Response to Mesothelin in Mesothelioma and Ovarian Cancer Patients. *Clinical Cancer Research* 2005 11(10): 3814–3820.

Hoeflerlin, L. A., C. E. Chalfant, and M. A. Park. Challenges in the Treatment of Triple Negative and HER2-Overexpressing Breast Cancer. *Journal of Surgery and Science* 2013 1(1): 3.

Hoff, E. R., R. R. Tubbs, J. L. Myles, and G. W. Procop. HER2/Neu Amplification in Breast Cancer: Stratification by Tumor Type and Grade. *American Journal of Clinical Pathology* 2002 117(6): 916–921.

Hofman, M.S., J. Violet, R.J. Hicks, J. Ferdinandus, et al. [177Lu]-PSMA-617 radionuclide treatment in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (LuPSMA trial): a single-centre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2018 19(6):825-833.

Holash, J., S. J. Wiegand, and G. D. Yancopoulos. New Model of Tumor Angiogenesis: Dynamic Balance between Vessel Regression and Growth Mediated by Angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999 18(38): 5356–5362.

Holdaway, I. M., and J. V. Bowditch. Variation in Receptor Status between Primary and Metastatic Breast Cancer. *Cancer* 1983 52(3): 479–485.

Hollevoet, K., E. Mason-Osann, X.-f. Liu, et al. In Vitro and In Vivo Activity of the Low-Immunogenic Antimesothelin Immunotoxin RG7787 in Pancreatic Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 2014 13(8): 2040–2049.

Holliger, P., and P. J. Hudson. Engineered Antibody Fragments and the Rise of Single Domains. *Nature Biotechnology* 2005 23(9): 1126–1136.

Hortelano, S., R. López-Fontal, P. G. Través, et al. ILK Mediates LPS-Induced Vascular Adhesion Receptor Expression and Subsequent Leucocyte Trans-Endothelial Migration†. *Cardiovascular Research* 2010 86(2): 283–292.

Huang, J., J. Zhang, H. Li, et al. VCAM1 Expression Correlated with Tumorigenesis and Poor Prognosis in High Grade Serous Ovarian Cancer. *American Journal of Translational Research* 2013 5(3): 336.

- Huang, R.-L., Z. Teo, H. C. Chong, et al. ANGPTL4 Modulates Vascular Junction Integrity by Integrin Signaling and Disruption of Intercellular VE-Cadherin and Claudin-5 Clusters. *Blood* 2011 118(14): 3990–4002.
- Hucl, T., J. R. Brody, E. Gallmeier, et al. High Cancer-Specific Expression of Mesothelin (*MSLN*) Is Attributable to an Upstream Enhancer Containing a Transcription Enhancer Factor–Dependent MCAT Motif. *Cancer Research* 2007 67(19): 9055–9065.
- Hunter, K. W., N. P. S. Crawford, and J. Alsarraj. Mechanisms of Metastasis. *Breast Cancer Research* 2008 10(1): S2.
- Hüsemann, Y., J. B. Geigl, F. Schubert, et al. Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer. *Cancer Cell* 2008 13(1): 58–68.
- Inoue, T., K. Yutani, T. Taguchi, et al. Preoperative Evaluation of Prognosis in Breast Cancer Patients by [18 F]2-Deoxy-2-Fluoro-D-Glucose-Positron Emission Tomography. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2004 130(5): 273–278.
- Iorns, E., K. Drews-Elger, T. M. Ward, et al. A New Mouse Model for the Study of Human Breast Cancer Metastasis. *PLoS ONE* 2012 7(10): e47995.
- Ito, T.-K., G. Ishii, S. Saito, et al. Degradation of Soluble VEGF Receptor-1 by MMP-7 Allows VEGF Access to Endothelial Cells. *Blood* 2009 113(10): 2363–2369.
- Jamal-Hanjani, M., S. A. Quezada, J. Larkin, and C. Swanton. Translational Implications of Tumor Heterogeneity. *Clinical Cancer Research* 2015 21(6): 1258–1266.
- Jeziarska, A., and T. Motyl. Matrix Metalloproteinase-2 Involvement in Breast. *Med Sci Monit* 2009 15(2): 32–40.
- Jin, G., Y. Han, C. Liu, et al. Evaluation of Biomarker Changes after Administration of Various Neoadjuvant Chemotherapies in Breast Cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2015 8(1): 914–921.
- Johnson, R. H., F. L. Chien, and A. Bleyer. Incidence of Breast Cancer With Distant Involvement Among Women in the United States, 1976 to 2009. *JAMA* 2013 309(8): 800.
- Johnston, F. Mc., M. C.B. Tan, B. R. Tan, et al. Circulating Mesothelin Protein and Cellular Antimesothelin Immunity in Patients with Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research* 2009 15(21): 6511–6518.
- Johnston, S. R. D, G. Saccani-Jotti, I. E. Smith, J. Newby, and M. Dowsett. Change in Oestrogen Receptor Expression and Function in Tamoxifen-Resistant Breast Cancer. *Endocrine Related Cancer* 1995 2(1): 105–110.
- Juneja, H.S, F.C Schmalsteig, S. Lee, J. Chen. Vasulcar cell adhesion molecule-1 and VLA-4 are obligatory adhesion proteins in the heterotypic adherence between human leukemia/lymphoma cells and marrow stromal cells. *Experimental Hematology* 1993 21(3):444-450.

Junttila, M. R., and F. J. de Sauvage. Influence of Tumour Micro-Environment Heterogeneity on Therapeutic Response. *Nature* 2013 501(7467): 346–354.

Kachala, S. S., A. J. Bograd, J. Villena-Vargas, et al. Mesothelin Overexpression Is a Marker of Tumor Aggressiveness and Is Associated with Reduced Recurrence-Free and Overall Survival in Early-Stage Lung Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research* 2014 20(4): 1020–1028.

Kalluri, R., and R. A. Weinberg. The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition. *Journal of Clinical Investigation* 2009 119(6): 1420–1428.

Kaneko, O., L. Gong, J. Zhang, et al. A Binding Domain on Mesothelin for CA125/MUC16. *Journal of Biological Chemistry* 2009 284(6): 3739–3749.

Karabulut, S., F. Tas, D. Tastekin, et al. The Diagnostic, Predictive, and Prognostic Role of Serum Epithelial Cell Adhesion Molecule (EPCAM) and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) Levels in Breast Cancer. *Tumor Biology* 2014 35(9): 8849–8860.

Kashiwagi, S., M. Yashiro, T. Takashima, et al. Advantages of Adjuvant Chemotherapy for Patients with Triple-Negative Breast Cancer at Stage II: Usefulness of Prognostic Markers E-Cadherin and Ki67. *Breast Cancer Research* 2011 13(6):R122.

Kawamata, F., S. Homma, H. Kamachi, et al. C-ERC/Mesothelin Provokes Lymphatic Invasion of Colorectal Adenocarcinoma. *Journal of Gastroenterology* 2014 49(1): 81–92.

Kayani, I, J. B. Bomanji, A. Groves, et al. Functional Imaging of Neuroendocrine Tumors with Combined PET/CT Using ⁶⁸Ga-DOTA-TATE (DOTA-DPhe1,Tyr3-Octreotate) And ¹⁸F-FDG. *Cancer* 2008 112(11): 2447–2455.

Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell* 2010 141(1): 52–67.

Keyaerts, M., C. Xavier, J. Heemskerk, et al. Phase I Study of ⁶⁸Ga-HER2-Nanobody for PET/CT Assessment of HER2 Expression in Breast Carcinoma. *Journal of Nuclear Medicine* 2016 57(1): 27–33.

Khatib, A-M., P. Auguste, L. Fallavollita, et al. Characterization of the Host Proinflammatory Response to Tumor Cells during the Initial Stages of Liver Metastasis. *The American Journal of Pathology* 2005 167(3): 749–759.

Klein, C. A., T. J. F. Blankenstein, O. Schmidt-Kittler, et al. Genetic Heterogeneity of Single Disseminated Tumour Cells in Minimal Residual Cancer. *The Lancet* 2002 360(9334): 683–689.

Klein, T., and R. Bischoff. Physiology and Pathophysiology of Matrix Metalloproteases. *Amino Acids* 2011 41(2): 271–290.

Klemke, M., T. Weschenfelder, M. H. Konstandin, and Y. Samstag. High Affinity Interaction of Integrin $\alpha 4 \beta 1$ (VLA-4) and Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) Enhances

Migration of Human Melanoma Cells across Activated Endothelial Cell Layers. *Journal of Cellular Physiology* 2007 212(2): 368–374.

Knights, A. J., A. P. W. Funnell, M. Crossley, and R. C. M. Pearson. Holding Tight: Cell Junctions and Cancer Spread. *Trends Cancer Research* 2012 ():61-69.

Kobayashi, K., T. Sasaki, F. Takenaka, et al. A Novel PET Imaging Using ⁶⁴ Cu-Labeled Monoclonal Antibody against Mesothelin Commonly Expressed on Cancer Cells. *Journal of Immunology Research* 2015 268172.

Koebel, C. M., W. Vermi, J. B. Swann, et al. Adaptive Immunity Maintains Occult Cancer in an Equilibrium State. *Nature* 2007 450(7171): 903–907.

Kokkinos, M. I., R. Wafai, M. K. Wong, et al. Vimentin and Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Breast Cancer – Observations in Vitro and in Vivo. *Cells Tissues Organs* 2007 185(1–3): 191–203.

Koleva-Kolarova, R. G., M. J. W. Greuter, M. van Kruchten, et al. The Value of PET/CT with FES or FDG Tracers in Metastatic Breast Cancer: A Computer Simulation Study in ER-Positive Patients. *British Journal of Cancer* 2015 112(10): 1617–1625.

Koolen, B. B., M-J. T. F. D. Vrancken Peeters, T. S. Aukema, et al. 18F-FDG PET/CT as a Staging Procedure in Primary Stage II and III Breast Cancer: Comparison with Conventional Imaging Techniques. *Breast Cancer Research and Treatment* 2012 131(1): 117–126.

Koren, S., and M. Bentires-Alj. Breast Tumor Heterogeneity: Source of Fitness, Hurdle for Therapy. *Molecular Cell* 2015 60(4): 537–546.

Kreitman, R. J., R. Hassan, D. J. FitzGerald, and I. Pastan. Phase I Trial of Continuous Infusion Anti-Mesothelin Recombinant Immunotoxin SS1P. *Clinical Cancer Research* 2009 15(16): 5274–5279.

Kumar, N., P. Patni, A. Agarwal, M.A. Khan, and Nidhi Parashar. Prevalence of Molecular Subtypes of Invasive Breast Cancer: A Retrospective Study. *Medical Journal Armed Forces India* 2015 71(3): 254–258.

Labelle, M., and R. O. Hynes. The Initial Hours of Metastasis: The Importance of Cooperative Host-Tumor Cell Interactions during Hematogenous Dissemination. *Cancer Discovery* 2012 2(12): 1091–1099.

Laheru, D., E. Lutz, J. Burke, et al. Allogeneic Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor-Secreting Tumor Immunotherapy Alone or in Sequence with Cyclophosphamide for Metastatic Pancreatic Cancer: A Pilot Study of Safety, Feasibility, and Immune Activation. *Clinical Cancer Research* 2008 14(5): 1455–1463.

Lamberts, L. E., C. W. Menke-van der Houven van Oordt, E. J. ter Weele, et al. ImmunoPET with Anti-Mesothelin Antibody in Patients with Pancreatic and Ovarian Cancer before Anti-Mesothelin Antibody-Drug Conjugate Treatment. *Clinical Cancer Research* 2016 22(7): 1642–1652.

Lamberts, L. E., D.J. A. de Groot, Rico D. Bense, E. G. E. de Vries, and R. S. N. Fehrmann. Functional Genomic mRNA Profiling of a Large Cancer Data Base Demonstrates Mesothelin Overexpression in a Broad Range of Tumor Types. *Oncotarget* 2015 6(29).

Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck. Molecular Mechanisms of Epithelial–Mesenchymal Transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014 15(3): 178–196.

Langley, R. R., and I. J. Fidler. The Seed and Soil Hypothesis Revisited-The Role of Tumor-Stroma Interactions in Metastasis to Different Organs. *International Journal of Cancer* 2011 128(11): 2527–2535.

Lanigan, F., D. O’Connor, F. Martin, and W. M. Gallagher. Common Molecular Mechanisms of Mammary Gland Development and Breast Cancer: Molecular Links between Mammary Gland Development and Breast Cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2007 64(24): 3159–3184.

Largillier, R., J.-M. Ferrero, J. Doyen, et al. Prognostic Factors in 1038 Women with Metastatic Breast Cancer. *Annals of Oncology* 2008 19(12): 2012–2019.

Larsson, S. C., C. S. Mantzoros, and A. Wolk. Diabetes Mellitus and Risk of Breast Cancer: A Meta-Analysis. *International Journal of Cancer* 2007 121(4): 856–862.

Läubli, H., and L. Borsig. Selectins Promote Tumor Metastasis. *Seminars in Cancer Biology* 2010 20(3): 169–177.

Le, D. T., D. G. Brockstedt, R. Nir-Paz, et al. A Live-Attenuated *Listeria* Vaccine (ANZ-100) and a Live-Attenuated *Listeria* Vaccine Expressing Mesothelin (CRS-207) for Advanced Cancers: Phase I Studies of Safety and Immune Induction. *Clinical Cancer Research* 2012 18(3): 858–868.

Le, Dung T., A. Wang-Gillam, V. Picozzi, et al. Safety and Survival With GVAX Pancreas Prime and *Listeria Monocytogenes* –Expressing Mesothelin (CRS-207) Boost Vaccines for Metastatic Pancreatic Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2015 33(12): 1325–1333.

Le, R. Q., L. Li, W. Yuan, et al. FDA Approval Summary: Tocilizumab for Treatment of Chimeric Antigen Receptor T Cell-Induced Severe or Life-Threatening Cytokine Release Syndrome. *The Oncologist* 2018 23(8):943-947.

Lee, D. W., J. N. Kochenderfer, M. Stetler-Stevenson, et al. T Cells Expressing CD19 Chimeric Antigen Receptors for Acute Lymphoblastic Leukaemia in Children and Young Adults: A Phase 1 Dose-Escalation Trial., *The Lancet* 2015 385(9967): 517–528.

Lee, K.H., E.Y. Choi, M.S. Hyun, et al. Association of Extracellular Cleavage of E-Cadherin Mediated by MMP-7 with HGF-Induced in Vitro Invasion in Human Stomach Cancer Cells. *European Surgical Research* 2007 39(4): 208–215.

Lee, M. C., and Lisa A. Newman Management of Patients with Locally Advanced Breast Cancer. *Surgical Clinics of North America* 2007 87(2): 379–398.

Lee, Y. W., H. Kühn, B. Hennig, Andrew S. Neish, and M. Toborek. IL-4-Induced Oxidative Stress Upregulates VCAM-1 Gene Expression in Human Endothelial Cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2001 33(1): 83–94.

Leek, R. D., C. E. Lewis, R. Whitehouse, et al. Association of Macrophage Infiltration with Angiogenesis and Prognosis in Invasive Breast Carcinoma. *Cancer Research* 1996 56(20): 4625–4629.

Leibovich-Rivkin, T., Y. Liubomirski, B. Bernstein, T. Meshel, and A. Ben-Baruch. Inflammatory Factors of the Tumor Microenvironment Induce Plasticity in Nontransformed Breast Epithelial Cells: EMT, Invasion, and Collapse of Normally Organized Breast Textures. *Neoplasia* 2013 15(12): 1330-IN5.

Levy-Lahad, E., and E. Friedman. Cancer Risks among BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *British Journal of Cancer* 2007 96(1): 11–15.

Li, M., U. Bharadwaj, R. Zhang, et al. Mesothelin Is a Malignant Factor and Therapeutic Vaccine Target for Pancreatic Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 2008 7(2): 286–296.

Li, Q., C. F. Verschraegen, J. Mendoza, and R. Hassan. Cytotoxic Activity of the Recombinant Anti-Mesothelin Immunotoxin, SS1 (DsFv) PE38, towards Tumor Cell Lines Established from Ascites of Patients with Peritoneal Mesotheliomas. *Anticancer Research* 2004 24(3A): 1327–1336.

Li, Q., H. Yan, Pengfei Zhao, Yifan Yang, and Bangwei Cao Efficacy and Safety of Bevacizumab Combined with Chemotherapy for Managing Metastatic Breast Cancer: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Scientific Reports* 2015 5(1). ht

Li, Y. R., R. R. Xian, A. Ziober, et al. Mesothelin Expression Is Associated with Poor Outcomes in Breast Cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2014 147(3): 675–684.

Libby, P., P. M. Ridker, and G. K. Hansson. Progress and Challenges in Translating the Biology of Atherosclerosis. *Nature* 2011 473(7347): 317–325.

Liedtke, C., C. Mazouni, K. R. Hess, et al. Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2008 26(8): 1275–1281.

Lin, K.-Y., D. Lu, C.-F. Hung, et al. Ectopic Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 as a New Mechanism for Tumor Immune Evasion. *Cancer Research* 2007 67(4): 1832–1841.

Lindenberg, L., A. Thomas, S. Adler, et al. Safety and Biodistribution of ¹¹¹In-Amatuximab in Patients with Mesothelin Expressing Cancers Using Single Photon Emission Computed Tomography-Computed Tomography (SPECT-CT) Imaging. *Oncotarget* 2015 6(6).

Lindström, L. S., E. Karlsson, U. M. Wilking, et al. Clinically Used Breast Cancer Markers Such As Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Are Unstable Throughout Tumor Progression. *Journal of Clinical Oncology* 2012 30(21): 2601–2608.

- Liu, S., S. M. Thomas, D. G. Woodside, et al. Binding of Paxillin to $\alpha 4$ Integrins Modifies Integrin-Dependent Biological Responses. *Nature* 1999 402(6762):676-681.
- Liu, Y-S, H-Y Lin, S-W Lai, et al. MiR-181b Modulates EGFR-Dependent VCAM-1 Expression and Monocyte Adhesion in Glioblastoma. *Oncogene* 2017 36(35): 5006–5022.
- Lou, X-L., J. Sun, S-Q Gong, et al. Interaction between Circulating Cancer Cells and Platelets: Clinical Implication. *Chin J Cancer Res* 2015 27(5): 11.
- Lu, P., V. M. Weaver, and Z. Werb. The Extracellular Matrix: A Dynamic Niche in Cancer Progression. *The Journal of Cell Biology* 2012 196(4): 395–406.
- Lu, X., E. Mu, Y. Wei, et al. VCAM-1 Promotes Osteolytic Expansion of Indolent Bone Micrometastasis of Breast Cancer by Engaging $A 4 \beta 1$ -Positive Osteoclast Progenitors. *Cancer Cell* 2011 20(6): 701–714.
- Luster, M., S. E. Clarke, M. Dietlein, et al. Guidelines for Radioiodine Therapy of Differentiated Thyroid Cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2008 35(10): 1941–1959.
- Ma, R., Y. Feng, S. Lin, et al. Mechanisms Involved in Breast Cancer Liver Metastasis. *Journal of Translational Medicine* 2015 13(1). Macacu, Alina, Philippe Autier, Mathieu Boniol, and Peter Boyle Active and Passive Smoking and Risk of Breast Cancer: A Meta-Analysis. *Breast Cancer Research and Treatment* 2015 154(2): 213–224.
- Maier, P., L. Hartmann, F. Wenz, and C. Herskind. Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *International Journal of Molecular Sciences* 2016 17(1): 102.
- Maimaiti, Y., C. Wang, M. Mushajiang, et al. Overexpression of VCAM-1 Is Correlated with Poor Survival of Patients with Breast Cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2016 9(7): 7451–7457.
- Malhotra, G. K., X. Zhao, H. Band, and V. Band. Histological, Molecular and Functional Subtypes of Breast Cancers. *Cancer Biology & Therapy* 2010 10(10): 955–960.
- Manso, L., F. Moreno, R. Márquez, et al. Use of Bevacizumab as a First-Line Treatment for Metastatic Breast Cancer. *Current Oncology* 2015 22(2): 51.
- Mantovani, A. Inflammation by Remote Control. *Nature* 2005 435(7043): 751.
- Mariotto, A. B., R. Etzioni, M. Hurlbert, L. Penberthy, and M. Mayer. Estimation of the Number of Women Living with Metastatic Breast Cancer in the United States. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2017 26(6): 809–815.
- Martin, T. A., and W. G. Jiang. Loss of Tight Junction Barrier Function and Its Role in Cancer Metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2009 1788(4): 872–891.
- Marusyk, A., and K. Polyak. Tumor Heterogeneity: Causes and Consequences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 2010 1805(1): 105–117.

- Matheny, H. E., T. L. Deem, and J. M. Cook-Mills. Lymphocyte Migration Through Monolayers of Endothelial Cell Lines Involves VCAM-1 Signaling Via Endothelial Cell NADPH Oxidase. *The Journal of Immunology* 2000 164(12): 6550–6559.
- Matsuno, O., E. Miyazaki, S. Nureki, et al. Role of ADAM8 in Experimental Asthma. *Immunology Letters* 2006 102(1): 67–73.
- Matsushita, H., M. D. Vesely, D. C. Koboldt, et al. Cancer Exome Analysis Reveals a T-Cell-Dependent Mechanism of Cancer Immunoediting. *Nature* 2012 482(7385): 400–404.
- Matthay, K. K., G. Yanik, J. Messina, et al. Phase II Study on the Effect of Disease Sites, Age, and Prior Therapy on Response to Iodine-131-Metaiodobenzylguanidine Therapy in Refractory Neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology* 2007 25(9): 1054–1060.
- Maude, S. L., N. Frey, P. A. Shaw, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *New England Journal of Medicine* 2014 371(16): 1507–1517.
- Maude, S. L., T. W. Laetsch, J. Buechner, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine* 2018 378(5): 439–448.
- Maurer, C.A., H. Friess, B. Kretschmann, et al. Over-Expression of ICAM-1, VCAM-1 and ELAM-1 Might Influence Tumor Progression in Colorectal Cancer. *International Journal of Cancer* 1998 79(76–81): 7.
- Maximiano, S., P. Magalhães, M. Pereira Guerreiro, and M. Morgado. Trastuzumab in the Treatment of Breast Cancer. *BioDrugs* 2016 30(2): 75–86.
- McGuire, A. H., F. Dehdashti, B. A. Siegel, et al. Positron Tomographic Assessment of 16a-[18F] Fluoro-17/3-Estradiol Uptake in Metastatic Breast Carcinoma. *Journal of Nuclear Medicine* 1991 7(32):1526-1531.
- McGuire WL, Horwitz KB, Pearson OH, Segaloff A. Current status of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Cancer* 1977 39(6).
- McIntosh, M.W., C. Drescher, B. Karlan, et al. Combining CA 125 and SMR Serum Markers for Diagnosis and Early Detection of Ovarian Carcinoma. *Gynecologic Oncology* 2004 95(1): 9–15.
- Mego, M., S. A. Mani, and M0 Cristofanilli. Molecular Mechanisms of Metastasis in Breast Cancer—Clinical Applications. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2010 7(12): 693–701.
- Mehlen, P., and A. Puisieux. Metastasis: A Question of Life or Death. *Nature Reviews Cancer* 2006 6(6): 449–458.
- Méjean, A., and T. Le Bret. La cascade métastatique : angiogenèse et nouveaux concepts. *Progrès en Urologie* 2008 18: S156–S166.
- Melaiu, O., J. Stebbing, Y. Lombardo, et al. MSLN Gene Silencing Has an Anti-Malignant

Effect on Cell Lines Overexpressing Mesothelin Deriving from Malignant Pleural Mesothelioma. Mitchell Ho, ed. PLoS ONE 2014 9(1): e85935.

Miettinen, M., and M. Sarlomo-Rikala. Expression of Calretinin, Thrombomodulin, Keratin 5, and Mesothelin in Lung Carcinomas of Different Types: An Immunohistochemical Analysis of 596 Tumors in Comparison With Epithelioid Mesotheliomas of the Pleura. *The American Journal of Surgical Pathology* 2003 27(2): 150–158.

Minn, A. J., G. P. Gupta, P. M. Siegel, et al. Genes That Mediate Breast Cancer Metastasis to Lung. *Nature* 2005 436(7050): 518.

Misri, R., K. Saatchi, S. S. W. Ng, U. Kumar, and U. O. Häfeli. Evaluation of ¹¹¹In Labeled Antibodies for SPECT Imaging of Mesothelin Expressing Tumors. *Nuclear Medicine and Biology* 2011 38(6): 885–896.

Monnier, J., S. Lewen, E. O'Hara, et al. Expression, Regulation, and Function of Atypical Chemerin Receptor CCRL2 on Endothelial Cells. *The Journal of Immunology* 2012 189(2): 956–967.

Montemagno, C., S. Bacot, M. Ahmadi, et al. Preclinical Evaluation of Novel Mesothelin-Specific Ligands for SPECT Imaging of Triple Negative Breast Cancer. *Journal of Nuclear Medicine* 2018 59(7):1056-1062..

Morello, A., M. Sadelain, and P. S. Adusumilli. Mesothelin-Targeted CARs: Driving T Cells to Solid Tumors. *Cancer Discovery* 2016 6(2): 133–146.

Morgat, C., G. MacGrogan, V. Brouste, et al. Expression of Gastrin-Releasing Peptide Receptor in Breast Cancer and Its Association with Pathologic, Biologic, and Clinical Parameters: A Study of 1,432 Primary Tumors. *Journal of Nuclear Medicine* 2017 58(9): 1401–1407.

Mori, Y. Anti- α 4 Integrin Antibody Suppresses the Development of Multiple Myeloma and Associated Osteoclastic Osteolysis. *Blood* 2004 104(7): 2149–2154.

Mortimer J.E., F. Dehdashti, B. A. Siegel, K. Trinkaus et al. Metabolic flare: indicator of hormone responsiveness in advanced breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2001 19(11):2797-2803.

Morvan, M. G., and L. L. Lanier NK Cells and Cancer: You Can Teach Innate Cells New Tricks. *Nature Reviews Cancer* 2016 16(1): 7–19.

Mossoba, M. E., M. Onda, J. Taylor, et al. Pentostatin Plus Cyclophosphamide Safely and Effectively Prevents Immunotoxin Immunogenicity in Murine Hosts. *Clinical Cancer Research* 2011 17(11): 3697–3705.

Moyret-Lalle, C., R. Pommier , C. Bouard et al. Plasticité des cellules cancéreuses et dissémination métastatique. *Médecine et Sciences*. 2016 32:725-731.

Mueller, M.M., NE. Fusenig. Friends or foes: bipolar effects of the tumor stroma in cancer. *Nature Review Cancer*. 2004 4:839-849.

Müller, A., B. Homey, H. Soto, et al. Involvement of Chemokine Receptors in Breast Cancer Metastasis. *Nature* 2001 410(6824): 50–56.

Muminova, Z. E., T. V. Strong, and D. R. Shaw. Characterization of Human Mesothelin Transcripts in Ovarian and Pancreatic Cancer. *BMC Cancer* 2004 4(1).

Muniyan, S., D. Haridas, S. Chugh, et al. MUC16 Contributes to the Metastasis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma through Focal Adhesion Mediated Signaling Mechanism. *Genes & Cancer*. 2016 7(3):110-124

Muyldermans, S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annual Review of Biochemistry* 2013 82(1): 775–797.

Nae Choon Yoo, Hyun Cheol Chung, Hei Cheol Chung, Joon Oh Park et al. Synchronous elevation of soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) correlates with gastric cancer progression. *Yonsei Medical Journal.*, 1998 39(1):27-36.

Nakai, K., M-C Hung, and H. Yamaguchi. A Perspective on Anti-EGFR Therapies Targeting Triple-Negative Breast Cancer. *American Journal of Cancer Research* 2016 6(8): 1609.

Nguyen, D. X., and J. Massagué. Genetic Determinants of Cancer Metastasis. *Nature Reviews Genetics* 2007 8(5): 341–352.

Nielsen, T. O., F. D. Hsu, G. Karaca, et al. Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2004 10: 5367–5374.

Nieman, K. M., H. A. Kenny, C. V. Penicka, et al. Adipocytes Promote Ovarian Cancer Metastasis and Provide Energy for Rapid Tumor Growth. *Nature Medicine* 2011 17(11): 1498–1503.

Nowell, P. The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations. *Science* 1976 194(4260): 23–28.

Oka, H., H. Shiozaki, K. Kobayashi, et al. Expression of E-Cadherin Cell Adhesion Molecules in Human Breast Cancer Tissues and Its Relationship to Metastasis. *Cancer Research* 1993 53: 1696–1701.

Okahara, H., H. Yagita, K. Miyake, and K. Okumura. Involvement of Very Late Activation Antigen 4 (VLA-4) and Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) in Tumor Necrosis Factor a Enhancement of Experimental Metastasis. *Cancer Research* 1994 54: 3233–3236.

Olafsen, T., and A. M. Wu. Antibody Vectors for Imaging. *Seminars in Nuclear Medicine* 2010 40(3): 167–181.

Olson, D. L., L. C. Burkly, D. R. Leone, B. M. Dolinski, and R. R. Lobb. Anti-A4 Integrin Monoclonal Antibody Inhibits Multiple Myeloma Growth in a Murine Model. *Mol Cancer Ther* 2005 4(1):91-99.

Opdam, F. L., H.-J. Guchelaar, J. H. Beijnen, and J. H. M. Schellens. Lapatinib for Advanced or Metastatic Breast Cancer. *The Oncologist* 2012 17(4): 536–542.

Ordóñez, N. G. Application of Mesothelin Immunostaining in Tumor Diagnosis: The American Journal of Surgical Pathology 2003 27(11): 1418–1428.

Orucevic, A., J. Chen, J. M. McLoughlin, et al. Is the TNM Staging System for Breast Cancer Still Relevant in the Era of Biomarkers and Emerging Personalized Medicine for Breast Cancer - An Institution's 10-Year Experience. *The Breast Journal* 2015 21(2): 147–154.

Osborn, L., C. Hession, R. Tizard, et al. Direct Expression Cloning of Vascular Cell Adhesion Molecule 1, a Cytokine-Induced Endothelial Protein That Binds to Lymphocytes. *Cell* 1989 59(6): 1203–1211.

Overall, C. M., and O. Kleinfeld. Towards Third Generation Matrix Metalloproteinase Inhibitors for Cancer Therapy. *British Journal of Cancer* 2006 94(7): 941–946.

Padua, D., X. H.-F. Zhang, Q. Wang, et al. TGF β Primes Breast Tumors for Lung Metastasis Seeding through Angiopoietin-like 4. *Cell* 2008 133(1): 66–77.

Pantel, K., and R. H. Brakenhoff. Dissecting the Metastatic Cascade. *Nature Reviews Cancer* 2004 4(6): 448–456.

Pantel, K., R. H. Brakenhoff, and B. Brandt. Detection, Clinical Relevance and Specific Biological Properties of Disseminating Tumour Cells. *Nature Reviews Cancer* 2008 8(5): 329–340.

Paoli, P., E. Giannoni, and P. Chiarugi. Anoikis Molecular Pathways and Its Role in Cancer Progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2013 1833(12): 3481–3498.

Parinyanitikul, N., G. R. Blumenschein, Y. Wu, et al. Mesothelin Expression and Survival Outcomes in Triple Receptor Negative Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer* 2013 13(5): 378–384.

Pastan, I., and R. Hassan. Discovery of Mesothelin and Exploiting It as a Target for Immunotherapy. *Cancer Research* 2014 74(11): 2907–2912.

Pastan, I., R. Hassan, D. J. FitzGerald, and R. J. Kreitman. Immunotoxin Therapy of Cancer. *Nature Reviews Cancer* 2006 6(7): 559–565.

Pekarek, L. A., B. A. Starr, A. Y. Toledano, and H. Schreiber. Inhibition of Tumor Growth by Elimination of Granulocytes. *Journal of Experimental Medicine* 1995 181(1): 435–440.

Perou, C. M., T. Sorlie, C. B. Eisen, et al. Molecular Portraits of Human Breast Tumours. *Nature* 2000 (406): 747–752.

Perou, C. M., T. Sorlie, M. B. Eisen, et al. Molecular Portraits of Human Breast Tumors. *Nature* 2000 406: 747–752.

- Peterson, L. M., D. A. Mankoff, T. Lawton, et al. Quantitative Imaging of Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer with PET and 18F-Fluoroestradiol. *Journal of Nuclear Medicine* 2008 49(3): 367–374.
- Piali L., A. Fichtel, H-J. Terpe, A. Imhof Beat and H. Gisler Roland. Endothelial Vascular Cell Adhesion Molecule 1 expression is suppressed by melanoma and carcinoma. *Journal of Experimental Medicine*. 1995 181:811-816.
- Pinder, S. E., S. Murray, I. O. Ellis, et al. The Importance of the Histologic Grade of Invasive Breast Carcinoma and Response to Chemotherapy. *Cancer* 1998 83(8): 1529–1539.
- Podar, K., A. Zimmerhackl, M. Fulciniti, et al. The Selective Adhesion Molecule Inhibitor Natalizumab Decreases Multiple Myeloma Cell Growth in the Bone Marrow Microenvironment: Therapeutic Implications: Evaluation of Natalizumab for MM Therapy. *British Journal of Haematology* 2011 155(4): 438–448.
- Prantner, A. M., M. Turini, B. Kerfelec, et al. Anti-Mesothelin Nanobodies for Both Conventional and Nanoparticle-Based Biomedical Applications. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 2015 11(7): 1201–1212.
- Prise, K. M., G. Schettino, M. Folkard, and K. D. Held. New Insights on Cell Death from Radiation Exposure. *The Lancet Oncology* 2005 6(7): 520–528.
- Qian, B-Z., J. Li, H. Zhang, et al. CCL2 Recruits Inflammatory Monocytes to Facilitate Breast-Tumour Metastasis. *Nature* 2011 475(7355): 222–225.
- Qian, B-Z, and J. W. Pollard. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell* 2010 141(1): 39–51.
- Quail, D. F, and J. A. Joyce. Microenvironmental Regulation of Tumor Progression and Metastasis. *Nature Medicine* 2013 19(11): 1423–1437.
- Rahbar, K., M. Schmidt, A. Heinzl, et al. Response and Tolerability of a Single Dose of 177Lu-PSMA-617 in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Multicenter Retrospective Analysis. *Journal of Nuclear Medicine* 2016 57(9): 1334–1338.
- Raica, M., A-A. Jitariu, and A. M. Cimpean. Lymphangiogenesis and Anti-Lymphangiogenesis in Cutaneous Melanoma. *Anticancer Research* 2016 36(9): 4427–4436.
- Rakha, E. A., J. S. Reis-Filho, F. Baehner, et al. Breast Cancer Prognostic Classification in the Molecular Era: The Role of Histological Grade. *Breast Cancer Research* 2010 12(4): 207.
- Rakha, E. A., D. S. P. Tan, W. D. Foulkes, et al. Are Triple-Negative Tumours and Basal-like Breast Cancer Synonymous? *Breast Cancer Research* 2007 9(6): 404.
- Ramaswamy, S., K. N. Ross, E. S. Lander, and T. R. Golub. A Molecular Signature of Metastasis in Primary Solid Tumors. *Nature Genetics* 2002 33(1): 49–54.
- Rebhun, R. B., H. Cheng, J. E. Gershenwald, et al. Constitutive Expression of the A4 Integrin

Correlates with Tumorigenicity and Lymph Node Metastasis of the B16 Murine Melanoma. *Neoplasia* 2010 12(2): 173–182.

Ren, G., X. Zhao, L. Zhang, et al. Inflammatory Cytokine-Induced Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Mesenchymal Stem Cells Are Critical for Immunosuppression. *The Journal of Immunology* 2010 184(5): 2321–2328.

Ren, Y. R., K. Patel, B. C. Paun, and S. E. Kern. Structural Analysis of the Cancer-Specific Promoter in Mesothelin and in Other Genes Overexpressed in Cancers. *Journal of Biological Chemistry* 2011 286(14): 11960–11969.

Reubi, J. C., S. Wenger, J. Schmuckli-Maurer, J-C. Schaer, and M. Gugger. Bombesin Receptor Subtypes in Human Cancers: Detection with the Universal Radioligand ¹²⁵I-[D-TYR6, ¹¹-ALA11, PHE13, NLE14] Bombesin(6–14). *Clinical Cancer Research* 2002 8: 1139–1146.

Rhim, A. D., E. T. Mirek, N. M. Aiello, et al. EMT and Dissemination Precede Pancreatic Tumor Formation. *Cell* 2012 148(1–2): 349–361.

Rice, G. E. Inducible Cell Adhesion Molecule 110 (INCAM-110) Is an Endothelial Receptor for Lymphocytes. A CD11/CD18-Independent Adhesion Mechanism. *Journal of Experimental Medicine* 1990 171(4): 1369–1374.

Rice, G. E., M. A. Gimbrone, and M. P. Bevilacqua. Tumor Cell-Endothelia Interactions 1988 133(2):204-210.

Rice, G.E., Bevilacqua MP. An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science*. 1989 246: 1303-1306.

Robinson, B. W. S., J. Creaney, R. Lake, et al. Soluble Mesothelin-Related Protein—A Blood Test for Mesothelioma. *Lung Cancer* 2005 49: S109–S111.

Rose, D. P., and L. Vona-Davis. The Cellular and Molecular Mechanisms by Which Insulin Influences Breast Cancer Risk and Progression. *Endocrine Related Cancer* 2012 19(6): R225–R241.

Rosen, P. P., C. J. Menendez-Botet, J. A. Urban, A. Fracchia, and M. K. Schwartz. Estrogen Receptor Protein (ERP) in Multiple Tumor Specimens from Individual Patients with Breast Cancer. *Cancer* 1977 39(5): 2194–2200.

Rosner, D., R. N. Bedwani, J. Vana, H. W. Baker, and G. P. Murphy. Noninvasive Breast Carcinoma: Results of a National Survey by the American College of Surgeons. *Annals of Surgery* 1980 192(2): 139.

Roulot A., D. Héquet, J-M Guinebrière, A-V-Salomon et al. Hétérogénéité tumorale des cancers du sein. *Annales de Biologie Clinique*. 2016 74(6)

Rump, A., Y. Morikawa, M. Tanaka, et al. Binding of Ovarian Cancer Antigen CA125/MUC16

to Mesothelin Mediates Cell Adhesion. *Journal of Biological Chemistry* 2004 279(10): 9190–9198.

Sancey, L., V. Ardisson, L. M. Riou, et al, In Vivo Imaging of Tumour Angiogenesis in Mice with the $\text{A}\alpha\text{v}\beta 3$ Integrin-Targeted Tracer $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RGD. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2007 34(12): 2037–2047.

Sänger, N., K. E. Effenberger, S. Riethdorf, et al. Disseminated Tumor Cells in the Bone Marrow of Patients with Ductal Carcinoma in Situ. *International Journal of Cancer* 2011 129(10): 2522–2526.

Sathyanarayana, B. K, Y. Hahn, M. S. Patankar, I. Pastan, and B. Lee. Mesothelin, Stereocilin, and Otoancorin Are Predicted to Have Superhelical Structures with ARM-Type Repeats. *BMC Structural Biology* 2009 9(1): 1.

Scalici, J. M., S. Thomas, C. Harrer, et al. Imaging VCAM-1 as an Indicator of Treatment Efficacy in Metastatic Ovarian Cancer. *Journal of Nuclear Medicine* 2013 54(11): 1883–1889.

Schlesinger, Ma., and G. Bendas. Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)-An Increasing Insight into Its Role in Tumorigenicity and Metastasis: VCAM-1 in Tumorigenicity. *International Journal of Cancer* 2015 136(11): 2504–2514.

Schmidt-Kittler, O., T. Ragg, A. Daskalakis, et al. From Latent Disseminated Cells to Overt Metastasis: Genetic Analysis of Systemic Breast Cancer Progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003 100(13): 7737–7742.

Scholler, N., N. Fu, Y. Yang, et al. Soluble Member(s) of the Mesothelin/Megakaryocyte Potentiating Factor Family Are Detectable in Sera from Patients with Ovarian Carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999 96(20): 11531–11536.

Schoppmann, S., A. Fenzl, K. Nagy, et al. VEGF-C Expressing Tumor-Associated Macrophages in Lymph Node Positive Breast Cancer: Impact on Lymphangiogenesis and Survival., *Surgery* 2006 139(6): 839–846.

Schumacher, D., B. Strilic, K. K. Sivaraj, N. Wettschureck, and S. Offermanns. Platelet-Derived Nucleotides Promote Tumor-Cell Transendothelial Migration and Metastasis via P2Y2 Receptor. *Cancer Cell* 2013 24(1): 130–137.

Servais, E. L., C. Colovos, L. Rodriguez, et al. Mesothelin Overexpression Promotes Mesothelioma Cell Invasion and MMP-9 Secretion in an Orthotopic Mouse Model and in Epithelioid Pleural Mesothelioma Patients. *Clinical Cancer Research* 2012 18(9): 2478–2489.

Seyfried, T. N., and L. C. Huysentruyt. On the Origin of Cancer Metastasis. *Critical Reviews in Oncogenesis* 2013 18(1–2): 43.

Shamamian, P., J. D. Schwartz, B. J. Z. Pockock, et al. Activation of Progelatinase A (MMP-2) by Neutrophil Elastase, Cathepsin G, and Proteinase-3: A Role for Inflammatory Cells in Tumor Invasion and Angiogenesis. *Journal of Cellular Physiology* 2001 189(2): 197–206.

Sharma, R., R. Sharma, T. P. Khaket, et al. Breast Cancer Metastasis: Putative Therapeutic Role of Vascular Cell Adhesion Molecule-1. *Cellular Oncology* 2017 40(3): 199–208.

Sharon, E., J. Zhang, K. Hollevoet, et al. Serum Mesothelin and Megakaryocyte Potentiating Factor in Pancreatic and Biliary Cancers. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2012 50(4).

Shimizu, A., S. Hirono, M. Tani, et al. Coexpression of MUC16 and Mesothelin Is Related to the Invasion Process in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Science* 2012 103(4): 739–746.

Shioi, K.-i., A. Komiya, K. Hattori, et al. Vascular Cell Adhesion Molecule 1 Predicts Cancer-Free Survival in Clear Cell Renal Carcinoma Patients. *Clinical Cancer Research* 2006 12(24): 7339–7346.

Shokouh, T. Z., A. Ezatollah, and P. Barand. Interrelationships Between Ki67, HER2/Neu, P53, ER, and PR Status and Their Associations With Tumor Grade and Lymph Node Involvement in Breast Carcinoma Subtypes: Retrospective-Observational Analytical Study. *Medicine* 2015 94(32): e1359.

Silva, H.C., F. Garcao, E. C. Coutinho, C. F. De Oliveria, and F. J. Regateiro. Soluble VCAM-1 and E-Selectin in Breast Cancer: Relationship with Staging and with the Detection of Circulating Cancer Cells. *Neoplasma* 2006 53(6): 538–543.

Slamon, D., W. Eiermann, N. Robert, et al. Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 2011 365(14): 1273–1283.

Smid, M., Y. Wang, Y. Zhang, et al. Subtypes of Breast Cancer Show Preferential Site of Relapse. *Cancer Research* 2008 68(9): 3108–3114.

Smith, A.J, J. Oertle, D. Warren and D. Prato. Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy for malignant cancers: Summary and perspective. 2016 2(2): 59-68.

Smith, G. Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science* 1985 228(4705): 1315–1317.

Sörensen, J., I. Velikyan, D. Sandberg, et al. Measuring HER2-Receptor Expression In Metastatic Breast Cancer Using [⁶⁸Ga]ABY-025 Affibody PET/CT. *Theranostics* 2016 6(2): 262–271.

Sørli, T., C. M. Perou, R. Tibshirani, et al. Gene Expression Patterns of Breast Carcinomas Distinguish Tumor Subclasses with Clinical Implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001 98(19): 10869–10874.

Sorlie, T., R. Tibshirani, J. Parker, et al. Repeated Observation of Breast Tumor Subtypes in Independent Gene Expression Data Sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003 100(14): 8418–8423.

- Soto, M., S. Serres, D. C. Anthony, and N. R. Sibson. Functional Role of Endothelial Adhesion Molecules in the Early Stages of Brain Metastasis. *Neuro-Oncology* 2014 16(4): 540–551.
- Spadiut, O., S. Capone, F. Krainer, A. Glieder, and C. Herwig. Microbials for the Production of Monoclonal Antibodies and Antibody Fragments. *Trends in Biotechnology* 2014 32(1): 54–60.
- Stamenkovic, I. Extracellular Matrix Remodelling: The Role of Matrix Metalloproteinases: Extracellular Matrix Remodelling. *The Journal of Pathology* 2003 200(4): 448–464.
- Stegner, D., S. Dütting, and B. Nieswandt. Mechanistic Explanation for Platelet Contribution to Cancer Metastasis. *Thrombosis Research* 2014 133: S149–S157.
- Steinbach, D., M. Onda, A. Voigt, et al. Mesothelin, a Possible Target for Immunotherapy, Is Expressed in Primary AML Cells. *European Journal of Haematology* 2007 79(4): 281–286.
- Stovgaard, E. S., D. Nielsen, E. Hogdall, and E. Balslev. Triple Negative Breast Cancer – Prognostic Role of Immune-Related Factors: A Systematic Review. *Acta Oncologica* 2018 57(1): 74–82.
- Stratton, M. R., P. J. Campbell, and P. A. Futreal. The Cancer Genome. *Nature* 2009 458(7239): 719–724.
- Strilic, B., and S. Offermanns. Intravascular Survival and Extravasation of Tumor Cells. *Cancer Cell* 2017 32(3): 282–293.
- Strilic, B., L. Yang, J. Albarrán-Juárez, et al. Tumour-Cell-Induced Endothelial Cell Necroptosis via Death Receptor 6 Promotes Metastasis. *Nature* 2016 536(7615): 215–218.
- Strosberg, J., G. El-Haddad, E. Wolin, et al. Phase 3 Trial of ¹⁷⁷Lu-Dotatate for Midgut Neuroendocrine Tumors. *New England Journal of Medicine* 2017 376(2): 125–135.
- Sugiura, T., S. Kageyama, A. Andou, et al. Oral Treatment with a Novel Small Molecule Alpha 4 Integrin Antagonist, AJM300, Prevents the Development of Experimental Colitis in Mice. *Journal of Crohn's and Colitis* 2013 7(11): e533–e542.
- Taichman, D. B., I. Djaffar, J. Teixid, G. E. Rice, and A. Aruffo. Tumor Cell Surface $\alpha_4\beta_1$ Integrin Mediates Adhesion to Vascular Endothelium: Demonstration of an Interaction with the N-Terminal Domains of INCAM-110/VCAM-1. *Cell Regulation* 1991 2(5):347-355.
- Takemoto, A., M. Okitaka, S. Takagi, et al. A Critical Role of Platelet TGF- β Release in Podoplanin-Mediated Tumour Invasion and Metastasis. *Scientific Reports* 2017 7: 42186.
- Takkunen, M., R. Grenman, M. Hukkanen, et al. Snail-Dependent and -Independent Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Carcinoma Cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2006 54(11): 1263–1275.
- Tamura, K., H. Kurihara, K. Yonemori, et al. ⁶⁴Cu-DOTA-Trastuzumab PET Imaging in

Patients with HER2-Positive Breast Cancer. *Journal of Nuclear Medicine* 2013 54(11): 1869–1875.

Tchou, J., L-C. Wang, B. Selven, et al. Mesothelin, a Novel Immunotherapy Target for Triple Negative Breast Cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2012 133(2): 799–804.

Tchouate, G., L. Olive, V. Caveliers, N. Devoogdt, et al. Localization, Mechanism and Reduction of Renal Retention of Technetium-99m Labeled Epidermal Growth Factor Receptor-Specific Nanobody in Mice. *Contrast Media & Molecular Imaging* 2011 6(2): 85–92.

Terwisscha van Scheltinga, A. G. T., A. Ogasawara, G. Pacheco, et al. Preclinical Efficacy of an Antibody–Drug Conjugate Targeting Mesothelin Correlates with Quantitative ⁸⁹ Zr-ImmunoPET. *Molecular Cancer Therapeutics* 2017 16(1): 134–142.

Tham, Y-L, K. Sexton, R. Kramer, S. Hilsenbeck, and R. Elledge. Primary Breast Cancer Phenotypes Associated with Propensity for Central Nervous System Metastases. *Cancer* 2006 107(4): 696–704.

Thomas, A. M., L. M. Santarsiero, E. R. Lutz, et al. Mesothelin-Specific CD8⁺ T Cell Responses Provide Evidence of In Vivo Cross-Priming by Antigen-Presenting Cells in Vaccinated Pancreatic Cancer Patients. *The Journal of Experimental Medicine* 2004 200(3): 297–306.

Thomas, A., Y. Chen, S. M. Steinberg, et al. High Mesothelin Expression in Advanced Lung Adenocarcinoma Is Associated with KRAS Mutations and a Poor Prognosis. *Oncotarget* 2015 6(13).

Tichet, M., V. Prod'Homme, N. Fenouille, et al. Tumour-Derived SPARC Drives Vascular Permeability and Extravasation through Endothelial VCAM1 Signalling to Promote Metastasis. *Nature Communications* 2015 6(1).

Till, B. G., M. C. Jensen, J. Wang, et al. Adoptive Immunotherapy for Indolent Non-Hodgkin Lymphoma and Mantle Cell Lymphoma Using Genetically Modified Autologous CD20-Specific T Cells. *Blood* 2008 112(6): 2261–2271.

Toft, D. J., and V. L. Cryns. Minireview: Basal-Like Breast Cancer: From Molecular Profiles to Targeted Therapies. *Molecular Endocrinology* 2011 25(2): 199–211.

Toft, D., and J. Gorski. A Receptor Molecule for Estrogens: Isolation from the Rat Uterus and Preliminary Characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1966 55(6): 1574–1581.

Toft, D., G. Shyamala, and Jack Gorski. A Receptor Molecule for Estrogens: Studies Using a Cell-Free System. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1967 57(6): 1740–1743.

Tomasek, J. J., G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier, and R. A. Brown. Myofibroblasts and Mechano-Regulation of Connective Tissue Remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2002 3(5): 349–363.

Tozbikian, G., E. Brogi, K. Kadota, et al. Mesothelin Expression in Triple Negative Breast

Carcinomas Correlates Significantly with Basal-like Phenotype, Distant Metastases and Decreased Survival., *PloS One* 2014 9(12): e114900.

Trimboli, A. J., K. Fukino, A. de Bruin, et al. Direct Evidence for Epithelial-Mesenchymal Transitions in Breast Cancer. *Cancer Research* 2008 68(3): 937–945.

Uehara, N., Y. Matsuoka, and A. Tsubura. Mesothelin Promotes Anchorage-Independent Growth and Prevents Anoikis via Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling Pathway in Human Breast Cancer Cells. *Molecular Cancer Research* 2008 6(2): 186–193.

Ulaner, G. A., D. M. Hyman, D. S. Ross, et al. Detection of HER2-Positive Metastases in Patients with HER2-Negative Primary Breast Cancer Using ⁸⁹Zr-Trastuzumab PET/CT. *Journal of Nuclear Medicine* 2016 57(10): 1523–1528.

Ullrich, A., and W. L. Mcguire. Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification. *Science* 1987 235(4785): 177–182.

Vaneycken, I., N. Devoogdt, N. Van Gassen, et al. Preclinical Screening of Anti-HER2 Nanobodies for Molecular Imaging of Breast Cancer. *The FASEB Journal* 2011 25(7): 2433–2446.

Vaupel, P. Hypoxia and Aggressive Tumor Phenotype: Implications for Therapy and Prognosis. *The Oncologist* 2008 13(Supplement 3): 21–26.

Velikova, G., R. Banks, A. Gearing, et al. Serum Concentrations of Soluble Adhesion Molecules in Patients with Colorectal Cancer. *British Journal of Cancer* 1998 77(11): 1857–1863.

Vestweber, D. How Leukocytes Cross the Vascular Endothelium. *Nature Reviews Immunology* 2015 15(11): 692–704.

van de Vijver, M. J., Y. D. He, L. J. van 't Veer, et al. A Gene-Expression Signature as a Predictor of Survival in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 2002 347(25): 1999–2009.

Vincke, C., and S. Muyldermans. Introduction to Heavy Chain Antibodies and Derived Nanobodies. *Methods Mol Biol.* 2012 911:15-26

Wang, K., V. Bodempudi, Z. Liu, et al. Inhibition of Mesothelin as a Novel Strategy for Targeting Cancer Cells. Lin Zhang, ed. *PLoS ONE* 2012 7(4): e33214.

Wang, L., Z. Niu, L. Zhang, et al. Clinicopathological Significance of Mesothelin Expression in Invasive Breast Cancer. *Journal of International Medical Research* 2012 40(3): 909–916.

Wang, P-C., C-C. Weng, Y-S. Hou, et al. Activation of VCAM-1 and Its Associated Molecule CD44 Leads to Increased Malignant Potential of Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2014 15(3): 3560–3579.

Wang, X., K. Zhang, L. Sun, J. Liu, and H. Lu. Short Interfering RNA Directed against Slug

Blocks Tumor Growth, Metastasis Formation, and Vascular Leakage in Bladder Cancer. *Medical Oncology* 2011 28(S1): 413–422.

Wang, Y., L. Wang, D. Li, H. B. Wang, and Q. F. Chen Mesothelin Promotes Invasion and Metastasis in Breast Cancer Cells. *Journal of International Medical Research* 2012 40(6): 2109–2116.

Wang, Y., and B. P. Zhou. Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Progression and Metastasis. *Chinese Journal of Cancer* 2011 30(9): 603–611.

Wärnberg, F., J. Bergh, M. Zack, and L. Holmberg. Risk Factors for Subsequent Invasive Breast Cancer and Breast Cancer Death after Ductal Carcinoma in Situ: A Population-Based Case-Control Study in Sweden. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 2001 10(5): 495–499.

Warren, G. W., A. J. Alberg, A. S. Kraft, and K. M. Cummings The 2014 Surgeon General’s Report: “The Health Consequences of Smoking-50 Years of Progress”: A Paradigm Shift in Cancer Care: Surgeon General’s Report and Cancer Care. *Cancer* 2014 120(13): 1914–1916.

Webster, D. J. T., D. G. Bronn, and J. P. Minton. Estrogen Receptor Levels in Multiple Biopsies from Patients with Breast Cancer. *The American Journal of Surgery* 1978 136(3): 337–338.

Weekes, C. D., L. E. Lamberts, M. J. Borad, et al. Phase I Study of DMOT4039A, an Antibody-Drug Conjugate Targeting Mesothelin, in Patients with Unresectable Pancreatic or Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 2016 15(3): 439–447.

ter Weele, E. J., A. G. T. Terwisscha van Scheltinga, J. G. W. Kosterink, et al. Imaging the Distribution of an Antibody-Drug Conjugate Constituent Targeting Mesothelin with ⁸⁹Zr and IRDye 800CW in Mice Bearing Human Pancreatic Tumor Xenografts. *Oncotarget* 2015 6(39): 42081.

van Wetering, S., N. van den Berk, J. D. van Buul, et al. VCAM-1-Mediated Rac Signaling Controls Endothelial Cell-Cell Contacts and Leukocyte Transmigration. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2003 285(2): C343–C352.

Wikman, H., R. Vessella, and K. Pantel. Cancer Micrometastasis and Tumour Dormancy. *APMIS* 2008 116(7–8): 754–770.

Witzel, I., L. Oliveira-Ferrer, K. Pantel, V. Müller, and H. Wikman. Breast Cancer Brain Metastases: Biology and New Clinical Perspectives. *Breast Cancer Research* 2016 18(1):8. al.,

Wolf, I., S. Sadetzki, R. Catane, A. Karasik, and B. Kaufman Diabetes Mellitus and Breast Cancer. *The Lancet Oncology* 2005 6(2): 103–111.

Wu, A. M., and P. D. Senter. Arming Antibodies: Prospects and Challenges for Immunoconjugates. *Nature Biotechnology* 2005 23(9): 1137–1146.

Wu, Q., J. Li, S. Zhu, et al. Breast Cancer Subtypes Predict the Preferential Site of Distant Metastases: A SEER Based Study. *Oncotarget* 2017 8(17): 27990.

Wu, T-C. The Role of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Tumor Immune Evasion. *Cancer Research* 2007 67(13): 6003–6006.

Wu, X., D. Li, L. Liu, et al. Serum Soluble Mesothelin-Related Peptide (SMRP): A Potential Diagnostic and Monitoring Marker for Epithelial Ovarian Cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 2014 289(6): 1309–1314.

Xavier, C., I. Vaneycken, M. D’huyvetter, et al. Synthesis, Preclinical Validation, Dosimetry, and Toxicity of ⁶⁸Ga-NOTA-Anti-HER2 Nanobodies for IPET Imaging of HER2 Receptor Expression in Cancer. *Journal of Nuclear Medicine* 2013 54(5): 776–784.

Xiang, X., M. Feng, M. Felder, et al. HN125: A Novel Immunoadhesin Targeting MUC16 with Potential for Cancer Therapy. *Journal of Cancer* 2011 2:280-291.

Xue, F., and K. B. Michels. Diabetes, Metabolic Syndrome, and Breast Cancer: A Review of the Current Evidence—. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2007 86(3): 823S–835S.

Yamaguchi, N., K. Hattori, M. Oh-eda, T. Kojima, N. Imai, N. Ochi. A novel cytokine exhibiting megakaryocyte potentiating activity from a human pancreatic tumor cell line HPC-Y5. *Journal of Biological Chemistry* 1994 269(2):805-808.

Yang, M-H., and K-J. Wu. TWIST Activation by Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1): Implications in Metastasis and Development. *Cell Cycle* 2008 7(14): 2090–2096.

Yang, Y-F, Y-Y. Liao, L-Q. Li, et al. Changes in ER, PR and HER2 Receptors Status after Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Pathology - Research and Practice* 2013 209(12): 797–802.

Yen, M. J. Diffuse Mesothelin Expression Correlates with Prolonged Patient Survival in Ovarian Serous Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2006 12(3): 827–831.

Yordanova, A., E. Eppard, S. Kürpig, et al. Theranostics in Nuclear Medicine Practice. *OncoTargets and Therapy* 2017 Volume 10: 4821–4828.

Yoshida, A., N. Hayashi, K. Suzuki, et al. Change in HER2 Status after Neoadjuvant Chemotherapy and the Prognostic Impact in Patients with Primary Breast Cancer. *Journal of Surgical Oncology* 2017 116(8): 1021–1028.

Yoshimura, N., M. Watanabe, S. Motoya, et al. Safety and Efficacy of AJM300, an Oral Antagonist of A4 Integrin, in Induction Therapy for Patients With Active Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 2015 149(7): 1775-1783.e2.

Yousry, T. A., E. O. Major, C. Ryschkewitsch, et al. Evaluation of Patients Treated with Natalizumab for Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *New England Journal of Medicine* 2006 354(9): 924–933.

Yusuf-Makagiansar, H., M. E. Anderson, T. V. Yakovleva, J. S. Murray, and T. J. Siahaan. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a Therapeutic Approach to Inflammation and Autoimmune Diseases. *Medicinal Research Reviews* 2002 22(2): 146–167.

Zafra, O., S. Frail, C. Gutiérrez, H. Amparo et al. Monitoring biodegradative enzymes with nanobodies raised in *Camelus dromedarius* with mixtures of catabolic proteins. *Environmental Microbiology*. 2011 13(4): 960-974.

Zhang, X., C. Liu, F. Hu, et al. PET Imaging of VCAM-1 Expression and Monitoring Therapy Response in Tumor with a ⁶⁸ Ga-Labeled Single Chain Variable Fragment. *Molecular Pharmaceutics*. 2018 15(2):609-618.

Zhang, Y., O. Chertov, J. Zhang, R. Hassan, and I. Pastan. Cytotoxic Activity of Immunotoxin SS1P Is Modulated by TACE-Dependent Mesothelin Shedding. *Cancer Research* 2011 71(17): 5915–5922.

Zhang, Y., L. Xiang, R. Hassan, and I. Pastan. Immunotoxin and Taxol Synergy Results from a Decrease in Shed Mesothelin Levels in the Extracellular Space of Tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007 104(43): 17099–17104.

Zhong, X-S, M. Matsushita, J. Plotkin, I. Riviere, and M. Sadelain. Chimeric Antigen Receptors Combining 4-1BB and CD28 Signaling Domains Augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL Activation and CD8+ T Cell-Mediated Tumor Eradication. *Molecular Therapy* 2010 18(2): 413–420.

Zhou, G., L. Yang, A. Gray, et al. The Role of Desmosomes in Carcinogenesis. *OncoTargets and Therapy* 2017 Volume 10: 4059–4063.

Résumé

Le cancer du sein est la première cause de cancer chez la femme. Au moment du diagnostic, 30 % des patientes présente une maladie métastatique avec atteinte ganglionnaire loco-régionale ou d'organes à distance. De plus, 20 % des femmes diagnostiquées sans métastases récidiveront dans les 5 ans. Les métastases sont traitées par chimiothérapie ou thérapie ciblée, en fonction des résultats histologiques du site primitif. Cependant, 20 à 45 % des métastases ont un phénotype différent de celui du site primitif. Pouvoir phénotyper les différentes métastases permettrait de traiter les patientes plus efficacement, en accord avec les caractéristiques moléculaires de ces lésions. Toutes les métastases n'étant pas accessibles à la biopsie, un phénotypage en imagerie moléculaire serait donc d'un grand intérêt. La médecine nucléaire est, à ce jour, la seule technique d'imagerie moléculaire disponible en pratique clinique. Dans le cadre de cette thèse, l'objectif a été de réaliser l'imagerie phénotypique des tumeurs métastatiques du sein en ciblant la mésothéline et VCAM-1 dans des modèles pré-cliniques de cancer du sein. La première partie de ce travail a été consacrée à l'évaluation pré-clinique de nanobodies ciblant la mésothéline, une glycoprotéine à ancre GPI très faiblement exprimée à l'état physiologique mais surexprimée dans de nombreux cancers dont le cancer du sein. De nombreuses thérapies ciblant la mésothéline sont actuellement en cours d'essais cliniques. Un agent d'imagerie ciblant cette protéine permettrait d'identifier les patientes susceptibles d'en bénéficier. Au cours de ces travaux de thèse, le nanobody ^{99m}Tc -A1 a été entièrement validé pour l'imagerie des tumeurs exprimant la mésothéline. La seconde partie de ces travaux de thèse a été consacrée à l'imagerie phénotypique des tumeurs du sein exprimant VCAM-1, protéine impliquée dans la dissémination métastatique pulmonaire et osseuse. Un agent d'imagerie ciblant VCAM-1 pourrait servir d'outil pour la caractérisation de l'agressivité de la maladie métastatique. Au cours de ces travaux, l'utilisation d'un nanobody, ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5, a été validée pour l'imagerie des tumeurs du sein exprimant VCAM-1.

Summary

Breast cancer is the leading cause of cancer among women. At the time of diagnosis, 30 % of patients have developed a metastatic disease either with regional lymph node colonization or distant organs colonization. Metastatic breast cancers are treated by chemotherapy or targeted therapy, according to histological results of primary site. However, 20 to 45 % of metastases have a different phenotype from the primary tumor. Getting access to metastases phenotype would therefore allow treating patients more accurately, in accordance with molecular characteristics of these lesions. Because metastases are not always accessible to biopsy, the use of molecular imaging could be of great interest. Nuclear medicine is the only molecular imaging technic available in clinical practice. The objective of this thesis was to perform the phenotypic imaging of metastatic breast cancer by targeting mesothelin and VCAM-1. The first part of this work was dedicated to the preclinical evaluation of mesothelin-targeting nanobodies. Mesothelin is a GPI-anchored membran protein. While its expression is restricted to a mesothelial cells in normal conditions, mesothelin is overexpressed in several cancers, including breast cancer. Several mesothelin-targeting therapies are currently ongoing clinical transfer. Identifying mesothelin-expressing metastases would allow to select patients who could benefit from those therapies. During this thesis, the nanobody-derived radiotracer ^{99m}Tc -A1 has been fully validated for the imaging of mesothelin expressing tumors. The second part of this work was dedicated to the nuclear imaging of VCAM-1 expressing breast cancer lesions. VCAM-1 is a membrane-associated protein involved in the metastatic spread of breast tumor cells. An imaging agent targeting at VCAM-1 could be a suitable tool to evaluate the role of VCAM-1 as a marker of tumor aggressiveness. In the present study, the nanobody ^{99m}Tc -cAbVCAM1-5 has been validated for the imaging of VCAM-1 expression in breast cancer.