

Université de Sherbrooke

Détection quantitative *in vivo* des récepteurs d'œstrogène par utilisation des traceurs 16α - ^{18}F fluoroestradiol et 4-fluoro- 11β -méthoxy- 16α - ^{18}F fluoroestradiol, et suivi d'hormonothérapie de tumeurs ER+ et ER α KD sur un modèle de souris par imagerie TEP

Par
Michel Paquette
Médecine nucléaire et radiobiologie

Thèse présentée à la faculté de médecine et des sciences de la santé
En vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (PhD)
en Sciences des Radiations et Imagerie Biomédicale

Sherbrooke, Québec, Canada
Décembre 2013

Membres du jury d'évaluation

Dr François Bénard, department of radiology, UBC
Dr Roger Lecomte, Sciences des radiations et imagerie biomédicale
Dr Benoit Paquette, Sciences des radiations et imagerie biomédicale
Dr Jean-Guy LeHoux, Département de biochimie
Dr Jean-Mathieu Beaugard, Département de radiologie, Université Laval

© Michel Paquette, 2013

Détection quantitative *in vivo* des récepteurs d'œstrogène par utilisation des traceurs 16α -[^{18}F]-fluoroestradiol et 4-fluoro-11 β -méthoxy- 16α -[^{18}F]-fluoroestradiol, et suivi d'hormonothérapie de tumeurs ER⁺ et ER α KD sur un modèle de souris par imagerie TEP

Par
Michel Paquette
Médecine nucléaire et radiobiologie

Thèse présentée à la faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (PhD) en imagerie biomédicale et sciences des radiations, FMSS, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

À partir des adénocarcinomes mammaires de souris MC7-L1 et MC4-L2, deux lignées exprimant le récepteur d'œstrogène α (ER α), de nouvelles lignées dont l'expression d'ER α est réprimée ont été créées (ER α KD). Ainsi, l'introduction d'une séquence shRNA ciblant ER α dans ces cellules par infection lentivirale a réduit d'environ 60% l'expression d'ER α , tel que confirmé par diverses techniques *in vitro*.

D'abord, un protocole d'imagerie TEP quantitative au FES a été validé en utilisant un modèle de souris porteuses de tumeurs ER⁺/ER α KD. En effet, une baisse notable (et similaire à la diminution d'expression d'ER α) du pourcentage de dose injectée par gramme (%ID/g) de FES a été observée dans les tumeurs ER α KD. De plus, les %ID/g obtenus *ex vivo* pour les tumeurs ER⁺ et ER α KD sont très similaires aux %ID/g obtenus par TEP au FES, supportant la validité de la méthode d'imagerie.

Ensuite, ces tumeurs ont été suivies pendant 14 jours par imagerie TEP quantitative au [^{18}F]-fluorodésoxyglucose (FDG) ou à la [^{11}C]-méthionine ([^{11}C]-MET) sous traitement avec différentes hormonothérapies, soient le tamoxifène, le letrozole et le fulvestrant. Les tumeurs ER⁺ ont capté moins de FDG et de [^{11}C]-MET que les tumeurs ER α KD après 7 et 14 jours de traitement. Les groupes traités ont une captation moindre des 2 traceurs par rapport au groupe non-traité pour leurs tumeurs ER⁺ après 7 et 14 jours de thérapie au fulvestrant et au letrozole, tandis que les tumeurs ER α KD ne sont pas affectées. Quant au traitement au tamoxifène, aucune différence de captation n'est observée par rapport au groupe non-traité. Ainsi, le protocole utilisé n'est pas assez sensible et à trop court terme pour voir l'effet connu à plus long terme du tamoxifène sur la croissance de ces tumeurs ER⁺.

Enfin, la captation et le contraste du 4FMFES ont été comparés au FES par imagerie TEP sur le même modèle de souris porteuses de tumeurs. La captation et le contraste se sont avérés supérieurs en utilisant le 4FMFES, comparés au FES, pour les tumeurs ER⁺. Les données *ex vivo* ont confirmé les résultats d'imagerie. En conclusion, le modèle ER⁺/ER α KD a un grand potentiel pour l'évaluation de nouveaux traceurs des ER, ainsi que pour le suivi de thérapies ciblant les ER.

Mots-clés : Imagerie TEP; récepteur d'oestrogène α (ER α); hormonothérapie; [^{18}F]-fluoroestradiol; 4-fluoro-11 β -méthoxy-16 α -[^{18}F]-fluoroestradiol

Table des matières

Résumé	ii
Liste des figures	vi
Liste des tableaux	viii
Liste des abréviations	ix
1. Introduction	1
1.1. Cancer du sein	1
1.2. Stades et grades du cancer du sein	2
1.3. Génétique du cancer du sein	3
1.3.1. Récepteur d'œstrogène alpha (ER α)	4
1.3.2. Récepteur d'œstrogène beta (ER β)	7
1.3.3. BRCA1	8
1.3.4. ErbB2	10
1.3.5. Récepteur de la progestérone (PgR)	12
1.4. Lignées cellulaires	14
1.5. Création de nouvelles lignées	15
1.5.1. ARN interférence (ARNi)	16
1.5.2. Induction d'ARNi dans des lignées cellulaires	19
1.5.3. Vecteurs lentiviraux	21
1.6. Agonistes et antagonistes des ER	23
1.6.1. Estradiol	25
1.6.2. Tamoxifène	27
1.6.3. Fulvestrant	28
1.6.4. Letrozole	29
1.7. Imagerie en tomographie d'émission par positrons (TEP)	30
1.7.1. Principes de la TEP	31
1.7.2. Isotopes utilisés en TEP	32
1.8. Traceurs utilisés en imagerie TEP	33
1.8.1. [^{18}F]-fluorodésoxyglucose (FDG)	34
1.8.2. 16 α -[^{18}F]-fluoroestradiol (FES)	35
1.8.3. 11 β -méthoxy-4,16 α -[16 α ^{18}F]-difluoroestradiol (4FMFES)	36
1.8.4. [^{11}C]-méthionine ([^{11}C]-MET)	37
1.8.5. [^{18}F]-fluorothymidine (FLT)	38
1.9. Description des projets	39
1.9.1. Problématique	39
1.9.2. Objectifs	41

2. Article 1: “[¹⁸ F]-Fluoroestradiol (FES) Quantitative PET imaging to differentiate ER+ and ER α -knockdown breast tumors in mice”	43
3. Article 2: “Quantitative follow-up of hormone therapy treatment in an ER+/ER α KD mouse tumor model using FDG and [¹¹ C]-methionine PET imaging”	65
4. Article 3: “Quantitative comparison of a novel estrogen receptor PET tracer, 4-fluoro-11 β -methoxy-16 α -[¹⁸ F]fluoroestradiol (4FMFES), with 16 α -[¹⁸ F]-fluoroestradiol (FES), by PET imaging of a breast cancer murine model”	92
5. Discussion	115
5.1. Lignées cellulaires	115
5.2. Imagerie TEP	121
5.2.1. Imagerie quantitative	121
5.2.2. Imagerie des récepteurs d’œstrogène	122
5.2.3. Suivi des traitements d’hormonothérapie	126
6. Résultats préliminaires et complémentaires	129
6.1. Imagerie de la prolifération	129
6.2. Résultats préliminaires TEP clinique au 4FMFES et FES	132
7. Conclusions et perspectives	140
8. Remerciements	144
9. Liste des références	145

Liste des figures

- Figure 1 :** Résumé des mécanismes moléculaires de l'ARN interférence (ARNi) à partir d'un ARN en tête d'épingle (shRNA) ou d'un ARN double brin (dsRNA). **18**
- Figure 2 :** Production de lentivirus porteurs d'une cassette d'expression de shRNA par une cellule productrice 293T, et infection d'une cellule-hôte. **23**
- Figure 3 :** Voie biochimique de la synthèse des hormones stéroïdiennes. **24**
- Figure 4 :** Structures chimiques de l'estradiol, ainsi que des agents d'hormonothérapie fulvestrant, letrozole et tamoxifène. **25**
- Figure 5 :** Structures chimiques des différents traceurs TEP utilisés. **34**
- Figure 6 :** Immunobuvardage contre ER α ou l'actin (contrôle) d'extraits de protéines des lignées MC7-L1 et MC4-L2, soit de type sauvage (ER+), ou infecté par un lentivirus portant différents shRNA. **117**
- Figure 7 :** Chromatographie liquide haute pression d'échantillons de sang de souris précipité à l'acétone, pris avant injection de thymidine phosphorylase (- enzyme) ou 30 et 60 minutes suivant l'injection de 1U/g de l'enzyme. **130**
- Figure 8 :** Image TEP coronale représentative au FLT de souris porteuses de tumeurs MC7-L1 et MC4-L2 (version ER+ ou ER α KD). **130**
- Figure 9 :** Image cérébrale TEP coronale, sagittale et axiale représentative au FLT de rat porteur d'une tumeur F98. **131**
- Figure 10 :** Exemple d'images TEP corps entier au FES et au 4FMFES d'une même patiente ayant une lésion primaire au sein gauche. **132**
- Figure 11 :** Captation (SUV) de FES et de 4FMFES des tissus non-spécifiques chez des patientes, évaluée par imagerie TEP. **134**
- Figure 12 :** Captation tumorale de FES et de 4FMFES chez des patientes, évaluée par imagerie TEP, selon le site des lésions. **134**
- Figure 13 :** Exemple d'images TEP au FES et au 4FMFES (coupe axiale) d'une même patiente ayant des métastases pulmonaires, ainsi qu'une tomодensitométrie (TDM) dans la même tranche axiale. **135**
- Figure 14 :** Exemple d'images TEP au FES et au 4FMFES d'une même patiente ayant des lésions primaires et axillaires. **136**

Figure 15: Chromatographie sur couche mince (TLC) en phase inversée d'échantillons de plasma, prélevés à différents temps suivant l'injection de FES ou de 4FMFES à des patientes. **137**

Figure 16 : Suivi dans le temps du % de traceur non métabolisé suivant l'injection de FES ou de 4FMFES à des patientes. **138**

Liste des tableaux

Tableau 1 :Ratio tumeur sur bruit de fond (T/B) de la TEP au FES et au 4FMFES, représentatif du contraste tumoral, de différents sites métastatique . **135**

Liste des abréviations

4FMFES = 11 β -Méthoxy-4,16 α -[16 α ¹⁸F]-difluoro-estradiol

4Max = 4 pixels d'intensité maximale

% ID/g = Pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu

ADN = Acide désoxyribonucléique

ARN = Acide ribonucléique

ATM = « Ataxia telangiectasia mutated »

ATR = « Ataxia telangiectasia and Rad3-related »

BARD1 = « BRCA-associated RING domain protein 1 »

BMax = Liaison maximale («Binding Maximum»)

BRCA1 = «Breast cancer type 1 susceptibility protein»

EDTA = Acide éthylène diamine tétra-acétique («Ethylene diamine tetraacetic acid»)

C-Met = [¹¹C]-Méthionine

CIMS = Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke

DBD = Domaine de liaison central à l'ADN

DMSO = Diméthylsulfoxyde

E₂ = Estradiol

ER = Récepteur d'oestrogène («Estrogen Receptor»)

ER α = Estrogen Receptor alpha

ER β = Estrogen Receptor beta

ERE = Élément de réponse œstrogénique (« Estrogen Response Element »)

GFP = Protéine verte fluorescente (« Green Fluorescent Protein »)

FBS = Sérum foetal bovin («Fetal Bovine Serum»)

FDG = [¹⁸F]-Fluorodésoxyglucose

FES = [¹⁸F]-Fluoroestradiol

FLT = [¹⁸F]-Fluorothymidine

HRP = Péroxydase de raifort (« Horseradish Peroxidase »)

i.v. = Intraveineux

i.p. = Intrapéritonéal

I κ B = Inhibiteur de NF κ B

IKK = I κ B kinase

KD = Répression génétique (« Knock-Down »)

keV = Kilo-électronvolt

LBD = Domaine de liaison du ligand (« Ligand Binding Domain »)

LTR = Répétitions terminales longues (« Long terminal repeats »)

mAb = Anticorps monoclonal

MBq = Mégabecquerel

mCi = Millicurie

MLEM = Maximum Likelihood Expectation Maximization

mm = Millimètre

MPA = Médroxyprogestérone Acétate

NF κ B = « Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells»

NLS = Signal de localisation nucléaire (« Nuclear localization signal »)

OD = Densité optique (« Optical Density »)

PBS = Saline tamponnée au phosphate (« Phosphate Buffered saline »)

PCR = Réaction de polymérase en chaîne (« Polymerase chain reaction »)

RING = « Really interesting new gene »; un domaine protéique en doigts de zinc

RITS = Répression transcriptionnelle induite par ARN (« RNA-induced transcriptional silencing »)

RT-PCR = Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction

RNAi = ARN-interférence

ROI = Région d'intérêt (« Region-of-interest »)

s.c. = Sous-cutanée

SERM = Modulateur sélectif des récepteurs d'œstrogène (« Selective Estrogen Receptor Modulator »)

shRNA = ARN en tête d'épingle (« small hairpin RNA »)

TBS = Saline tamponnée au tris (« Tris-buffered saline »)

TEP = Tomographie d'émission par positrons

1. Introduction

1.1 Cancer du sein

Selon la Société canadienne du cancer, 173 800 nouveaux cas de cancer (tous les types confondus, en excluant le cancer de la peau) seront déclarés, et seront responsables de 76 200 décès au Canada en 2010. Du nombre total de cas, 48,3% (83 945) seront des femmes. Entre autres, on estime à 23 400 le nombre de femmes qui recevront un diagnostic de cancer du sein en 2011 (28% des cas féminins) et à 5 100 le nombre de celles qui en mourront. Ce cancer se place au 1^{er} rang pour ce qui est de l'incidence chez les femmes; 1 femme sur 9 risque d'avoir un cancer du sein au cours de sa vie, et 1 femme sur 29 en mourra. Comme pour tous les cancers, le dépistage et le diagnostic précoces du cancer du sein sont cruciaux pour sa guérison.

Parmi les approches thérapeutiques utilisées, la chimiothérapie et l'hormonothérapie sont les plus courantes pour pallier à la progression du cancer du sein en récidive. L'hormonothérapie obtient un taux de réponse de 50 à 60% lorsque les sujets ont des tumeurs récurrentes positives aux récepteurs stéroïdiens. Ce taux de réussite chute à 10% en cas de négativité en récepteurs de la tumeur. D'où l'importance de connaître le statut en récepteurs hormonaux des lésions, puisque cette information s'avère cruciale pour décider du protocole thérapeutique à suivre. Par ailleurs, un enjeu important dans la lutte contre le cancer du sein récidivant est le développement de résistance aux traitements de chimiothérapie et d'hormonothérapie, un problème majeur expliquant les succès de certaines interventions contre cette maladie. Lors du diagnostic de récidive, la présence de récepteurs hormonaux est utile pour guider la conduite de la thérapie et prévoir la réponse aux traitements de deuxième ligne. Or, la méthode établie pour déterminer ce statut est la biopsie, ce qui n'est pas toujours possible en présence de métastases ou de récidives difficiles d'accès.

La vaste majorité des tumeurs du sein sont des adénocarcinomes, c'est-à-dire qu'elles se forment dans les tissus glandulaires. Les adénocarcinomes incluent les carcinomes canaux et les carcinomes lobulaires. Le premier type (le plus fréquent) provient de cellules des canaux galactophores (chargés de transporter le lait), alors que le second se développe dans les lobules.

1.2 Stades et grades du cancer du sein

L'évaluation de paramètres tels que la taille, le potentiel invasif, la présence de métastases, ainsi que l'implication de ganglions axillaires permettent de classer les cancers du sein par stade en clinique. Cet outil pronostique donne des indices quant aux thérapies à utiliser, aux chances de succès de ces thérapies, à l'évolution de la maladie, etc.

D'abord, la stadification est donnée par trois indices : T (taille de la tumeur primaire), N (« nodes », ganglions) et M (métastases). TX indique que la tumeur primaire est « invisible », alors que T0 dénote l'absence de tumeur primaire. De T1 à T3, la taille de la tumeur va en croissant (de moins de 2 cm pour T1 à plus de 5 cm pour T3), alors que T4 décrit une tumeur de toute taille ayant débordé de la paroi thoraxique. Pour ce qui est de l'indice « N », Nx signifie que l'on ne peut vérifier l'état des ganglions, et N0 dénote l'absence de tumeurs ganglionnaires. N1 et N2 indiquent une atteinte tumorale à des ganglions axillaires, alors que N3 reflète la présence de tumeurs à plus de 10 ganglions axillaires et/ou à des ganglions infra- ou supraclaviculaires. Enfin, M1 indique la présence de métastases distales, alors que M0 exclut une telle possibilité. L'ensemble de ces paramètres sont rassemblés pour classer les tumeurs en stades allant de I (tumeur locale sans atteinte ganglionnaire) à IV (métastase distales). Le stade 0 indique une tumeur bénigne ou *in situ*. Les taux de survie 5 ans après diagnostic sont de 100% pour les stades 0 et I, et chutent graduellement pour atteindre 20% pour les lésions de stade IV (Société canadienne du cancer).

Le grade est un indicateur pronostique de la malignité de la lésion basé sur l'examen microscopique (morphologie et vitesse de division) d'un échantillon de biopsie, et se chiffre de 1 à 3 sur l'échelle du système de classification de Scarff-Bloom-Richardson. Plus le grade est élevé, plus la tumeur croît rapidement et a des risques de se propager. En particulier, trois paramètres sont étudiés, soit le pourcentage de formation de tubules, la taille du noyau cellulaire et le compte mitotique, chacun recevant un score de 1 à 3. Si la somme de ces trois paramètres est entre 3 et 5, la tumeur est de grade 1, alors qu'une somme entre 6 et 7 indique un grade 2 et une somme de 8 à 9 signifie une tumeur de grade 3.

Bien que ces classifications soient d'une grande utilité en clinique pour évaluer l'état de la maladie chez des patients, elle n'est pas appropriée pour décrire des modèles de rongeurs porteurs de tumeurs communément étudiées en recherche. Notamment, dans les modèles animaux, les tumeurs sont implantées à des sites prédéterminés et croissent à la taille voulue par l'expérimentateur, avec des conditions contrôlées. De toute manière, dans les études précliniques, le génotype et le phénotype des lignées cancéreuses établies et des greffes tumorales sont habituellement connus plus en détails et rendent caduque l'utilisation de stades et de grades.

1.3 Génétique du cancer du sein

En clinique, la connaissance de divers paramètres (notamment génétiques) permettent d'avoir un pronostic plus précis et de guider les choix de thérapie optimaux. Ainsi, pour le cancer du sein, la présence ou non de certains gènes sont cruciaux pour estimer les chances de guérison, de récurrence, quels sont les meilleurs traitements, etc. Ainsi, voici un aperçu de quelques gènes d'intérêt pour le cancer du sein. Ces gènes sont aussi présents chez les rongeurs (avec des séquences à homologie variable) et les mécanismes moléculaires découlant de ces gènes sont comparables à l'humain.

1.3.1. Récepteur d'œstrogène alpha (ER α)

Un des facteurs génétiques les mieux caractérisés pour le cancer du sein est le récepteur d'œstrogène alpha (ER α). L'existence d'un récepteur capable de lier spécifiquement les œstrogènes a été proposée pour la première fois dans les années 60 (Jensen, 1966). Ce n'est qu'en 1986 que le premier ADN complémentaire (ADNc) endodant pour ER α (à ce moment, le seul ER) a été cloné de la lignée de cancer mammaire humain MCF-7 (Green *et al.*, 1986). Cette protéine de 66 kDa (595 acides aminés) fait partie de la famille des récepteurs stéroïdiens. ER α a comme ligand naturel principal l'estradiol (E₂), et à de moindres mesures des métabolites de l'estradiol (estrone, estriol, etc). Lorsqu'une molécule de E₂ s'attache à ER α , il y a dimérisation du récepteur, ce qui l'active.

La structure d'un monomère d'ER α est composée de 6 domaines, nommés de A à F (Kumar *et al.*, 1987). D'abord, les domaines A et B (180 acides aminés) contiennent la fonction d'activation 1 (AF1: « Activation Function 1 »), qui est une fonction d'activation constitutive (activable par phosphorylation) contribuant à l'activité pro-transcriptionnelle d'ER α . Ensuite, le domaine C, appelé aussi domaine de liaison de l'ADN (DBD: « DNA Binding Domain » ; 83 acides aminés), est responsable de la liaison des dimères d'ER α à des séquences d'ADN spécifiques. Le domaine D, quant à lui, est long de seulement 39 acides aminés et contient le signal de localisation nucléaire (NLS: « Nuclear Localization Signal ») responsable de l'exportation de la protéine vers le noyau. Enfin, les domaines E et F (293 acides aminés) portent le domaine de liaison au ligand (LBD: « Ligand-Binding Domain »), un domaine de dimérisation, un deuxième signal de localisation au noyau, et la fonction d'Activation 2 (AF2: « Activation Function 2 »). Contrairement à AF1 (qui est ligand-indépendant), AF2 a une fonction d'activation de la transcription qui dépend de la présence du ligand pour être active.

La principale fonction d'ER α en est une de co-facteur sélectif de transcription. Lorsqu'activé, les dimères d'ER α lié à une molécule de E₂ s'attachent à des éléments de réponse à l'œstrogène (ERE; séquence longue de 13 bases)

par le biais du DBD, permettant ainsi l'activation de la transcription des gènes régulés en aval par un ERE. Les origines évolutives des ERE ont été explorées chez *Xenopus laevis*, un batracien, où les gènes codant pour des vitellogenines sont régulés par des ERE contenant des séquences parfaitement palindromiques (Klein-Hitpass *et al.*, 1988). Par contre, la plupart des ERE des génomes de la souris et de l'humain sont des séquences contenant des palindromes imparfaits, et certaines conditions dans la séquence sont essentielles pour le fonctionnement de l'ERE (Anolik *et al.*, 1995; Driscoll *et al.*, 1998). Ainsi, une fois attaché au site ERE, ER α permet le recrutement du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF en conjonction avec des histones acétyltransférases (HAT); l'ouverture de la chromatine qui en résulte est un prérequis pour l'initiation de la transcription (Direnzo *et al.*, 2000). TGF α (Vyhlidal *et al.*, 2000), VEGF (Mueller *et al.*, 2000), et le récepteur de la progestérone (PR; Scott *et al.*, 1997) sont des exemples parmi tant d'autres de gènes activés par le récepteur d'œstrogène (une liste exhaustive est présentée dans une revue sur le sujet de O'Lone *et al.*, 2004).

Outre son activité de co-facteur de transcription, ER α a la capacité d'interagir avec la voie de signalisation NF κ B (revue dans Kalaitzidis et Gilmore, 2005). Ainsi, des doses non physiologiques d'œstrogène (10 μ M) ont pu inhiber l'activité kinase de IKK, un régulateur en amont de la voie NF κ B (Simoncini *et al.*, 2000). Aussi, les lignées de cancer du sein étant ER+ ont des niveaux de I κ B (Inhibiteur de NF κ B) plus élevés que les lignées ER- (Nakshatri *et al.*, 1997). Enfin, il a été observé que les récepteurs d'œstrogène pouvaient inhiber l'attachement de NF κ B sur l'ADN, et que ce processus pouvait être important pour la physiologie des os. L'œstrogène peut inhiber l'ostéoclastogénèse par inhibition de l'expression NF κ B-dépendant de IL-6 (Boyce *et al.*, 1999).

ER α partage avec d'autres récepteurs stéroïdiens la capacité de se faire ajouter un groupe palmitate dans le domaine E, ce qui entraîne sa localisation à la membrane plasmique (Razandi *et al.*, 2003). Des monomères membranaires

d'ER α se dimérisent en présence d'estradiol et génèrent un signal rapide (Razandi *et al.*, 2004). Des dimères d'ER α membranaires liés à de l'estradiol peuvent recruter des récepteurs couplés à des protéines G (GPCR), menant à la transduction d'un signal *via* la voie Ras/Raf/MEK (Kumar *et al.*, 2007). Les principaux effets observés par la signalisation rapide d'ER α membranaire sont une prolifération cellulaire accrue et de la vasodilatation induite par stimulation de eNOS (Pedram *et al.*, 2006). Certains groupes (dont Revankar *et al.*, 2005) ont suggéré que la signalisation rapide estradiol-dépendante résultait de l'action de la protéine GPR30, un récepteur couplé à des protéines G. Or, une série d'articles (résumé brillamment dans les revues de Levin, 2009, et de Langer *et al.*, 2009) infirme l'importance de GPR30 pour ce phénomène et appuie la thèse voulant que ce soit bel et bien des récepteurs d'œstrogène « classiques », localisés à la membrane, qui seraient responsables de la signalisation rapide.

Aussi, ER α peut être phosphorylé et activé par plusieurs kinases, entraînant une activation ligand-indépendante (Schiff *et al.*, 2003). Les phosphorylations ont lieu dans le domaine AF1 (sérine 118, sérine 167, thréonine 311), et dans d'autres domaines à la suite de l'activation de certaines voies de signalisation (tels que MAPK/ERK, ou PI3K/AKT) en réponse à des cytokines et des facteurs de croissance (Bunone *et al.*, 1996; Campbell *et al.*, 2001).

Les tumeurs mammaires exprimant ER α ont tendance à croître plus lentement (et par conséquent à avoir un indice d'incorporation de thymidine faible), et à avoir un phénotype plus différencié que les tumeurs ER- (Henderson et Patek, 1998). Environ 70% des patientes atteintes d'un cancer du sein ont un statut positif en ER. La proportion de tumeurs ER+ (par rapport aux tumeurs ER-) augmente avec l'âge (Yasui et Potter, 1999) et est plus élevée chez les femmes ménopausées que pré-ménopausées (Osborne, 1998). Les patientes ayant des tumeurs ER+ sont dirigées la plupart du temps vers un traitement hormonal, accompagné ou non de chimiothérapie. Cinquante à 60% des patientes ER+ recevant de l'hormonothérapie voient leur lésion se stabiliser ou régresser (McGuire *et al.*, 1975), alors qu'il y a régression de(s) tumeur(s) pour seulement 5-

10% des patientes ayant une lésion ER- (McGuire *et al.*, 1980). Parmi les patientes ayant une tumeur primaire ER+ et qui ont une récurrence, 20 à 40% des cas auront une récurrence avec un statut ER- (Castagnetta *et al.*, 1987; Johnston *et al.*, 1995). Il est à noter que 1 à 2% des patientes ER+ ont des niveaux faibles du récepteur, à la limite du négatif, et sont considérées comme « positif limite ». En clinique, l'appellation « ER » fait toujours référence à ER α . Les anticorps utilisés en histopathologie sur les biopsies ciblent uniquement ER α , et seul ER α a une valeur pronostique reconnue.

1.3.2. Récepteur d'œstrogène beta (ER β)

Avant 1996, il n'y avait qu'un récepteur d'œstrogène de connu (alpha). Cette année-là, un deuxième récepteur ayant de l'affinité pour l'œstradiol a été cloné chez plusieurs espèces, dont l'humain (Mosselman *et al.*, 1996). Dès lors, la nomenclature a changé pour distinguer entre le premier récepteur d'œstrogène (alpha : ER α) et celui récemment découvert (beta : ER β). Puisque ce nouveau gène se situe sur le chromosome 14 chez l'humain (alors que ER α est sur le chromosome 6), ces récepteurs d'œstrogène ne sont pas des variantes d'épissage alternatif, mais bien deux gènes distincts (Enmark *et al.*, 1997). De même, chez la souris, ER β (appelé aussi Esr2) est localisé dans la région centrale du chromosome 12 (Tremblay *et al.*, 1997), alors que ER α est situé sur le chromosome 10 (Sluysers *et al.*, 1988).

ER β est une protéine de 485 acides aminés (55 kDa) chez l'humain et chez la souris (Enmark *et al.*, 1997; Tremblay *et al.*, 1997). La structure d'ER β est très similaire à celle d'ER α et est aussi découpée en 6 domaines (A à F) ayant des fonctions très similaires aux domaines homonymes d'ER α . Le domaine C (contenant le DBD) d'ER β a une homologie de 97% avec celui d'ER α , tandis que le domaine E des 2 protéines a une homologie de 59,1%; ces 2 parties sont relativement semblables chez les 2 protéines. D'un autre côté, des différences significatives peuvent être observées entre les domaines A-B, D et F des 2 protéines (homologie de 17,5%, 30% et 17,9%, respectivement). Malgré la forte

homologie entre les DBD des 2 protéines, ER β a une plus faible affinité pour les ERE qu'ER α (Hyder *et al.*, 1999). Aussi, ER β a différentes conformations spécifiques aux différents ERE, résultant à un recrutement différentiel de coactivateurs de transcription (Loven *et al.*, 2001). Ces deux phénomènes contribuent aux différences en activité transcriptionnelle entre ER β et ER α . De plus, ER β a été décrit comme étant capable de moduler l'activité transcriptionnelle d'ER α en altérant le recrutement de c-Jun et c-Fos aux sites ERE des gènes pS2 et du récepteur de progestérone, 2 gènes à la transcription estradiol-dépendante (Matthews *et al.*, 2006)

Peu de données sont disponibles quant à la répartition des tumeurs ER β + et ER β - chez les patientes atteintes de cancer du sein, et la valeur clinique de ce récepteur n'est pas établie (Speirs *et al.*, 2004; Balfe *et al.*, 2004). Néanmoins, il est à noter que le tissu sain du sein exprime plus d'ER β que d'ER α , et que cette proportion est inversée lors de la carcinogénèse (Bardin *et al.*, 2004; Skliris *et al.*, 2003).

1.3.3. BRCA1

BRCA1 est une protéine de 1863 acides aminés de long (220 kDa) localisée majoritairement dans le noyau (Chen *et al.*, 1996). Au niveau de sa structure, plusieurs parties sont d'importance pour sa fonction. La première est un domaine « RING finger » en N-terminal, important pour les interactions protéine-protéine (Hashizume *et al.*, 2001). Par exemple, un des partenaires de BRCA1 est la protéine BARD1, capables tous deux de former un hétérodimère RING; le complexe BRCA1-BARD1 a une forte activité ubiquitine ligase (Hashizume *et al.*, 2001). Dans sa région centrale, la présence de deux séquences NLS permet la localisation nucléaire de BRCA1. Aussi, entre les acides aminés 1280 et 1524, il y a le « SQ-cluster domain » (SCD), un domaine riche en sérine/thréonine suivi d'un résidu glutamine (SQ ou TQ), chaque SQ ou TQ étant un site potentiel de phosphorylation (Venkitaraman, 2002). Enfin, du côté C-terminal, il y a présence d'une paire de domaine BRCT (BRCA1 C-Terminal); il est suggéré que les BRCT

permettent la liaison de BRCA1 à des phosphopeptides, avec une haute affinité pour les résidus phosphosérine et phosphothréonine (Manke *et al.*, 2003).

Pour ce qui est des fonctions, BRCA1 joue un rôle ubiquitaire dans la cellule au niveau de la stabilité génomique en général. Ainsi, il a été rapporté que BRCA1 est impliqué dans la réponse et la réparation aux dommages à l'ADN, dans la régulation du cycle cellulaire, la maintenance de l'ADN, la recombinaison, la régulation de la transcription, l'ubiquitination de protéines cibles et le remodelage de la chromatine (revue dans Yarden et Papa, 2006, et dans Venkitaraman, 2002). L'implication de BRCA1 dans la réparation de l'ADN est la mieux connue et sera décrite plus en détails. Ainsi, BRCA1 est capable d'être phosphorylé en réponse à des dommages à l'ADN par les protéines kinases ATM (Cortez *et al.*, 1999) et ATR (Chen, 2000). La kinase Chk2 (pour « checkpoint »), aussi phosphorylée par ATM et ATR, peut également phosphoryler BRCA1 lorsqu'elle est activée (Lee *et al.*, 2000); BRCA1 peut donc être phosphorylée en amont et en aval de la voie de signalisation des bris à l'ADN. Aussi, la protéine BRCA1 est essentielle pour la phosphorylation par ATM et ATR de la protéine Chk1, étape essentielle pour l'activation du point de contrôle G₂/M suite à un dommage à l'ADN (Yarden *et al.*, 2002). Non seulement BRCA1 agit comme signal pour la réponse aux dommages, mais est aussi un acteur clé dans la recombinaison homologue (HR). Une évidence à cela est que BRCA1 se co-localise rapidement aux sites de dommages contenant des histones phosphorylées H2AX (Paul *et al.*, 2000). Il en est de même pour le complexe de réparation Mre11/Rad50/NBS1 et pour Rad51, qui se colocalise aussi avec BRCA1 à ces sites (Paul *et al.*, 2000). Aussi, les cellules déficientes en BRCA1 ont une sensibilité accrue aux radiations ionisantes (Foray *et al.*, 1999) et aux agents causant des bris double brin (tel le cisplatine; Bhattacharyya *et al.*, 2000). Or, la recombinaison homologue a comme rôle, outre la réparation des bris double brin à l'ADN, de résoudre et de redémarrer les fourches de réplication « effondrées » (« collapsed replication forks ») causées par des bris simple brin lorsque la synthèse translésion (TLS) et la réversion de la fourche ne peuvent compenser.

BRCA1 est le premier gène de susceptibilité au cancer du sein identifié par analyse d'historique de familles ayant plusieurs occurrences hâtives de cancer du sein et/ou des ovaires. Environ 3 à 5% des cancers du sein sont une conséquence d'une mutation dans le gène BRCA1 (Ford *et al.*, 1994). Les porteurs d'un allèle mutant de BRCA1 ont 50% à 80% de risque de développer un cancer du sein avant 70 ans (Ford *et al.*, 1994; Easton *et al.*, 1995; Hortobagyi, 1998). Plus de 70% des tumeurs mammaires BRCA1 mutantes sont négatives en récepteur œstrogène (Loman *et al.*, 1998)

1.3.4. ErbB2

Le gène ErbB2, aussi appelé HER2 chez l'humain et *neu* pour les rongeurs, fait partie de la famille des récepteurs de facteurs de croissance épithéliale (EGFR: « epithelial growth factor receptor »). En fait, le gène EGFR humain est aussi nommé « HER1 », témoignant de l'appartenance à cette famille.

La famille EGFR (ou HER) correspond à des récepteurs de facteurs de croissance transmembranaire de type I capables d'activer des voies de signalisation intracellulaires en réponse à des signaux extracellulaires (des ligands tels que EGF, heréguline, TGF- α , et plusieurs autres) (Yarden et Sliwkowski, 2001, Bazley et Gullick, 2005). Lorsqu'un ligand s'attache à un récepteur de cette famille, il y a une dimérisation suivie d'une transphosphorylation de leurs domaines transmembranaires. La dimérisation ainsi induite dépend de la nature du ligand et des changements de conformation qu'il induit; la plupart du temps, des hétérodimères sont produits. Les résidus tyrosine ainsi phosphorylés mènent à l'activation de nombreuses voies qui dépendent de seconds messagers, et à du signalement croisé (« crosstalk ») avec d'autres récepteurs transmembranaires (Moasser, 2007). Il va sans dire que les effets biologiques qui en découlent sont nombreux et variés.

Quant à ErbB2, c'est une protéine de 185 kDa ayant comme particularité de ne pas se lier aux ligands caractéristiques de la famille EGFR (récepteur orphelin). En fait, ErbB2 est constitutivement actif (sans l'aide de ligand (Cho *et al.*, 2003)), et son signal est enclenché par hétérodimérisation avec un autre membre (avec ligand) de sa famille (Sliwkowski, 2003). ErbB2 semble être essentiel au développement embryonnaire; la délétion de ce gène entraîne la mort à la migration chez la souris par la présence de malformations cardiaques et cérébrales (Lee *et al.*, 1995). Chez la souris adulte, ErbB2 semble avoir un rôle à jouer dans la différenciation des tissus mammaires et la lactation (Jones et Stern, 1999). Par le fait que ErbB2 a la plus forte activité kinase des membres de sa famille, et que les hétérodimères contenant ErbB2 ont le plus fort potentiel de signalisation (Graus-Porta *et al.*, 1997), il n'est pas étonnant qu'une dérégulation de l'expression de ce gène a un potentiel oncogène. En effet, une surexpression du proto-oncogène *c-neu*, ou une mutation ponctuelle V664E (appelé neuT), induisent la formation de tumeurs chez le rongeur (Siegel *et al.*, 1999; Weiner *et al.*, 1989). Chez l'humain, la surexpression de Her2 est associée à la tumorigénèse dans 25 à 30% des cancers du sein et ovariens (Slamon *et al.*, 1989, Tsuda, 2001). De plus, la surexpression de Her2 dans des lignées cellulaires et des modèles tumoraux a été associée à une mitose plus rapide, à la transformation cancéreuse, à une motilité cellulaire supérieure et à un risque métastatique accru (Olayiole *et al.*, 2000).

Il est d'intérêt de noter le rôle important que semble jouer ErbB2 dans le développement de résistance aux hormonothérapies par le biais de signalement croisé avec ER α . En effet, des cellules MCF-7 rendues résistantes au tamoxifène *in vitro* ont un niveau plus élevé de EGFR et d'ErbB2, ainsi qu'une phosphorylation accrue de MAPK, AKT et d'ER α (Nicholson *et al.*, 2004). Aussi, dans ces cellules, la phosphorylation et la transcription dépendante d'ER α a pu être induite par l'ajout de peptides EGF (un ligand des EGFR), ce qui mène à une expression accrue de TGF- α et de AR (d'autres ligands peptidiques EGFR), soutenant ainsi une boucle d'auto-activation autocrine EGFR/ErbB2 (Hutcheson *et al.*, 2003). Le même genre

de phénomène a pu être observé dans des tumeurs MCF-7 rendues résistantes à l'inhibiteur d'aromatase letrozole : une augmentation de la phosphorylation d'ER α et une surexpression d'ErbB2 (Brodie *et al.*, 2005). L'utilisation de l'anticorps transtuzumab (anti-ErbB2) sur ces mêmes tumeurs a renversé la résistance au letrozole (Sabnis *et al.*, 2009). Aussi, l'expression de EGFR (Yarden *et al.*, 1996) et d'ErbB2 (Dati *et al.*, 1990) *in vitro* est diminuée par un traitement longue durée à l'estradiol. En parallèle, il a été observé que la résistance au fulvestrant est associée avec une activation de la voie EGFR/ErbB2 et à une indépendance aux œstrogènes (McClelland *et al.*, 2001). Un modèle de tumeurs MCF-7 ER+ surexprimant HER-2/neu ont développé une résistance au fulvestrant après 3 mois de traitement, accompagnée d'une perte d'ER α et d'une phosphorylation accrue de HER2. L'utilisation d'inhibiteurs de EGFR (gefitinib) et de HER2 ont ralenti l'apparition de résistance au fulvestrant (Massarweh *et al.*, 2006). Enfin, plusieurs essais cliniques ont été faits ou sont en cours pour évaluer l'efficacité des thérapies hormonales combinées à des inhibiteurs des EGFR (Ellis, 2004; Bauerfeind *et al.*, 2010; Davoli *et al.*, 2010).

1.3.5. Récepteur de la progestérone (PR)

Le récepteur de la progestérone (PR) est exprimé en deux isoformes, PRA et PRB, produits du même gène, mais avec une initiation de la transcription alternative entre deux promoteurs distincts (Kastner *et al.*, 1990, Kraus *et al.*, 1993). PRB est l'isoforme dont la séquence est « complète », de 933 acides aminés (99 kDa), alors que PRA est tronqué de 164 acides aminés (83 kDa) en N-terminal en raison d'un 2^e codon d'initiation de la transcription en amont du premier (Kastner *et al.*, 1990). Il fait partie de la famille des récepteurs nucléaires, et présente des similitudes de structure et de fonction avec les récepteurs d'oestrogènes. En effet, PR est aussi séparé en 6 domaines (A à F) : A et B portent la fonction d'activation de transcription constitutive (TAF1), C contient un domaine de liaison à l'ADN (DBD) et un signal de localisation nucléaire (NLS), et E porte une fonction d'activation de transcription activé par la progestérone (TAF2) et est le site de dimérisation et de liaison au ligand (LBD) en carboxyl-terminal

(Lapidus *et al.*, 1998). De plus, il y a plusieurs éléments d'activation (AF) et d'inhibition (IF) interagissant avec des corégulateurs de la transcription (Huse *et al.*, 1998). L'attachement d'un agoniste (le principal étant la progestérone) à son LBD entraînera la localisation nucléaire, la dimérisation et l'attachement du récepteur à des éléments de réponse aux progestines (PRE), résultant en une transcription dépendante de la progestérone des gènes porteurs de PRE dans leurs promoteurs (Gronemeyer, 1991)

Alors que chez les humains la majorité des tissus sains qui expriment PR ont un ratio PRA/PRB de 1 (Mote *et al.*, 1999), ce ratio montre une prédominance de PRA dans les tissus utérins et mammaires (3 :1), et vaginaux (2 :1) chez la souris (Schneider *et al.*, 1991). Il a été démontré chez la souris que PRB était important pour le développement mammaire normal (Mulac-Jericevic *et al.*, 2003), alors que PRA est essentiel pour le développement utérin et les fonctions reproductives (Mulac-Jericevic *et al.*, 2000; Mote *et al.*, 2006). Par contre, dans les tumeurs mammaires et utérines humaines PR+, il y a prédominance d'un isoforme sur l'autre dans la majorité des cas, suggérant qu'un déséquilibre du ratio d'expression PRA/PRB est un événement précoce dans la carcinogénèse de ces tissus (Mote *et al.*, 2002; Arnett-Mansfield *et al.*, 2001).

En clinique, le récepteur de la progestérone est un des principaux marqueurs utilisés en histopathologie pour les cancers du sein. En combinaison avec le récepteur d'œstrogène α , il fournit des informations importantes quant au pronostic de la maladie. La moitié des tumeurs mammaires ER+ sont également PR+, et constitue le groupe étant le plus susceptible de répondre aux thérapies hormonales (tamoxifène). Malgré la présence d'ER, les tumeurs ER+/PR- sont moins susceptibles de réagir à ces mêmes traitements que des tumeurs ER-/PR+ (McGuire *et al.*, 1978). De plus, la perte de l'expression de PR est associée à des tumeurs plus agressives et à un pronostic aggravé (Clarke *et al.*, 2004).

1.4. Lignées cellulaires

De nombreuses lignées cellulaires de cancer du sein humain sont établies et utilisées en recherche, chacune ayant des caractéristiques qui leur sont propres. Par exemple, la lignée MCF-7, la plus utilisée en recherche, et la lignée T47D, sont ER+, tandis que la lignée MDA-MB-468 (par exemple) est ER-. Néanmoins, bien qu'étant un modèle plus près de la réalité que les tumeurs animales, les xénogreffes de tumeurs humaines sur des souris nécessitent que ces dernières soient immunodéficientes pour éviter un rejet de la greffe. Or ces souris immunodéficientes (notamment les Balb/c *nu/nu*) coûtent beaucoup plus cher que les souris Balb/c de type sauvage; il faut donc prendre en considération cet important facteur lors de la conception d'un projet et du choix du modèle animal. De plus, un modèle immunodéficient exclut le rôle que pourrait jouer le système immunitaire sur la croissance et le comportement tumoral.

Il existe également plusieurs lignées de cancers mammaires murins, la plupart provenant de la race de souris Balb/c. Néanmoins, rares sont les lignées murines établies qui sont ER+. Un groupe de recherche a induit l'apparition d'adénocarcinomes mammaires dépendants des progestines par administration sur plusieurs mois de médroxyprogestérone acétate (MPA) à des souris Balb/c (Lanari *et al.*, 2001). Les cultures primaires qui en ont résulté ont permis l'établissement de 5 lignées cellulaires, les MC4-L1, MC4-L2, MC4-L3, MC4-L5 et MC7-L1. Le caryotype de toutes ces lignées, à l'exception des MC7-L1, a été analysé en détail (Fabris *et al.*, 2003). De ce nombre, 2 lignées, les MC7-L1 et les MC4-L2, possèdent des caractéristiques les rendant particulièrement intéressantes. D'abord, toutes deux possèdent ER α et le récepteur de la progestérone (PR) en quantités appréciables (pouvant être considérées comme étant ER+ et PR+; Lanari *et al.*, 2001). Ensuite, ces lignées étant d'origine murine, des souris Balb/c de type sauvage suffisent pour l'implantation *in vivo* de ces tumeurs. Aussi, elles ont une vitesse de croissance rapide *in vitro* (18,7 heures de vitesse de dédoublement pour les MC4-L2, et 20 heures pour les MC7-L1) et *in*

vivo (tumeurs atteignant 30 mm³ en environ 21 jours), ce qui est pratique pour les expériences. Enfin, bien qu'elles soient sensibles à différents agents d'hormonothérapie *in vivo* (Aliaga *et al.*, 2004), elles ne nécessitent pas de suppléments d'estradiol pour croître *in vivo* et *in vitro*. La somme de ces caractéristiques explique pourquoi les lignées tumorales MC7-L1 et MC4-L2 ont été choisies comme outil de base pour les différents travaux de cette thèse.

1.5. Création de nouvelles lignées

Pour tester les limites de détection et la capacité à discerner différents types de tumeurs des traceurs visant les ER, ainsi que pour le suivi comparatif d'hormonothérapie par imagerie TEP, la mise au point d'un modèle approprié était de prime importance. Pour ce faire, l'idéal est d'une part d'observer la captation des traceurs dérivés de l'œstrogène et l'effet des thérapies sur des tumeurs ER+, et d'autre part de comparer ces paramètres avec des tumeurs ER- pour ainsi avoir un modèle comparatif contenant les deux situations opposées. Or, un modèle ER+/ER- comporte certains problèmes, tous causés par le fait de comparer 2 lignées ayant une génétique, une provenance et un historique différents. Afin d'avoir deux lignées dont la seule différence est l'expression d'ER α , une approche alternative consiste à créer des mutants de délétion (« knock-out », ou KO) du gène ER α à partir des lignées MC7-L1 et MC4-L2. Or, si le nombre d'allèles à supprimer est théoriquement de 2 chez les MC4-L2 (le chromosome 10 est diploïde; Fabris *et al.*, 2003), nous ne connaissons rien du caryotype de la lignée MC7-L1. De plus, puisqu'il faut supprimer chaque allèle avec un marqueur de sélection différent, le processus peut être long et nécessite un antibiotique par allèle supprimé. Enfin, une délétion complète d'un gène peut ne pas être viable, ou modifier le phénotype et les patrons d'expression des gènes de façon marquée; or, le deuxième cas revient presque à utiliser une lignée complètement différente.

Donc, ces considérations encouragent l'utilisation d'une approche plus nuancée.

1.5.1. ARN interférence (ARNi)

L'ARN interférence est un phénomène tout d'abord observé dans les plantes (Jorgensen, 1990) et le fungus *Neurospora crassa* (Romano et Macino, 1992), où l'introduction d'oligonucléotide d'ARN sens (correspondant à la séquence de l'ARNm) à un gène a induit une réduction de l'expression du gène visé. Des études ultérieures ont démontré que ce mécanisme est conservé dans la plupart des organismes eucaryotes (revue dans Hammond *et al.*, 2001). En fait, la répression des gènes de cette manière régule des processus biologiques tels que la transition d'un stade du développement à un autre (Pasquinelli et Ruvkun, 2002). Aussi, les mécanismes de l'ARN interférence constituent une immunité primitive du génome contre des infections virales et des éléments transposables (Obbard *et al.*, 2009), notamment contre l'influenza A (Matskevich et Moeling, 2007), quoique d'une efficacité limitée (les virus ayant développés des mécanismes pour contourner l'ARNi, entre autres).

À la recherche d'une méthode autre que la recombinaison homologue pour supprimer l'expression de gènes dans le nématode microscopique *Caenorhabditis elegans*, un groupe a étudié la capacité qu'auraient des ARN anti-sens (complémentaire et inversé) à un ARNm cible à reproduire cet effet (Fire *et al.*, 1998). Les travaux de Fire et Mello ont mené à la découverte que des ARN double brin étaient beaucoup plus efficaces que des ARN anti-sens pour la répression de gènes spécifiques, et ont mené au prix Nobel de Physiologie et Médecine en 2006.

Ainsi, la découverte qu'il était possible de cibler l'expression de gènes spécifiques par introduction de séquences d'ARN double brin (siRNA) correspondant à une partie de ces gènes dans les cellules de mammifères (Elbashir *et al.*, 2001) a révolutionné la recherche en y apportant un nouvel outil pour étudier les modulations et interactions entre gènes. Aussi, plusieurs applications thérapeutiques de cette technologie ont été testées pour une pléthore de conditions où des gènes (oncogènes, gènes viraux, etc) sont surexprimés, par

exemple divers types de cancers, l'asthme, le SIDA et l'hépatite (revue dans Angali *et al.*, 2010). Plusieurs essais cliniques sont complétés ou en cours (revue dans Burnett *et al.*, 2011, et dans Sliva et Schnierle, 2010).

Les mécanismes moléculaires de l'ARN interférence sont connus avec plus de détails dans la mouche *Drosophila melanogaster*, mais les mécanismes et les différentes protéines et complexes impliqués sont présumés être semblables chez les mammifères. La figure 1 présente un résumé de ces mécanismes. D'abord, un long ARN double brin (ARNdb), est reconnu et clivé d'une manière ATP-dépendante par le complexe enzymatique Dicer (une ARNase III) pour ainsi former des ARN double brin de 21 à 23 paires de bases appelés « ARN court interférant » (« short interfering RNA » ou siRNA) (Hammond *et al.*, 2000, Bernstein *et al.*, 2001). Par, contre, les ARNdb de plus de 30 paires de bases provoquent une cascade de phosphorylation menant à une réponse aux interférons de type I ayant de nombreux effets non-spécifiques (dont un arrêt global de la traduction protéique et un métabolisme altéré; Gil et Esteban, 2000). L'utilisation alternative d'un ARN court en tête d'épingle (« short hairpin RNA » ou shRNA, substrat de Dicer), ou directement d'un siRNA, permet de contourner ce problème. Par la suite, le siRNA est introduit dans un « complexe de répression induit par ARN » (« RNA-induced Silencing complex », ou RISC). Suite au déroulement du siRNA (étape demandant de l'ATP), seul le brin dont l'extrémité 5' est la moins stable thermodynamiquement (et qui est anti-sens par rapport à l'ARNm cible) est conservé dans le complexe RISC (Tomari *et al.*, 2004). L'incorporation de ce brin d'ARN (aussi appelé ARN-guide) dans le complexe multiprotéique RISC active ce dernier (appelé alors « holo-RISC »). L'ARN-guide sera alors utilisé pour reconnaître l'ARNm correspondant, et le complexe holo-RISC, par sa composante Ago2 (une ARNi endonucléase, appelée aussi « Slicer »), clivera l'ARNm ciblé (Liu *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2004). L'ARNm clivé sera finalement dégradé par des ARNases. La reconnaissance de la cible par l'ARN-guide est très spécifique : une différence d'une base (selon la position) peut rendre l'ARNi inefficace (Amarzguioui *et al.*, 2003), tandis qu'un allèle pathogène ne comportant qu'une base muté peut être

spécifiquement réprimé sans affecter l'allèle de type sauvage (Miller *et al.*, 2004). L'effet global sera de réduire le nombre de copies transcrites pour le gène ciblé, et donc de réprimer (« silencing ») l'expression de ce gène.

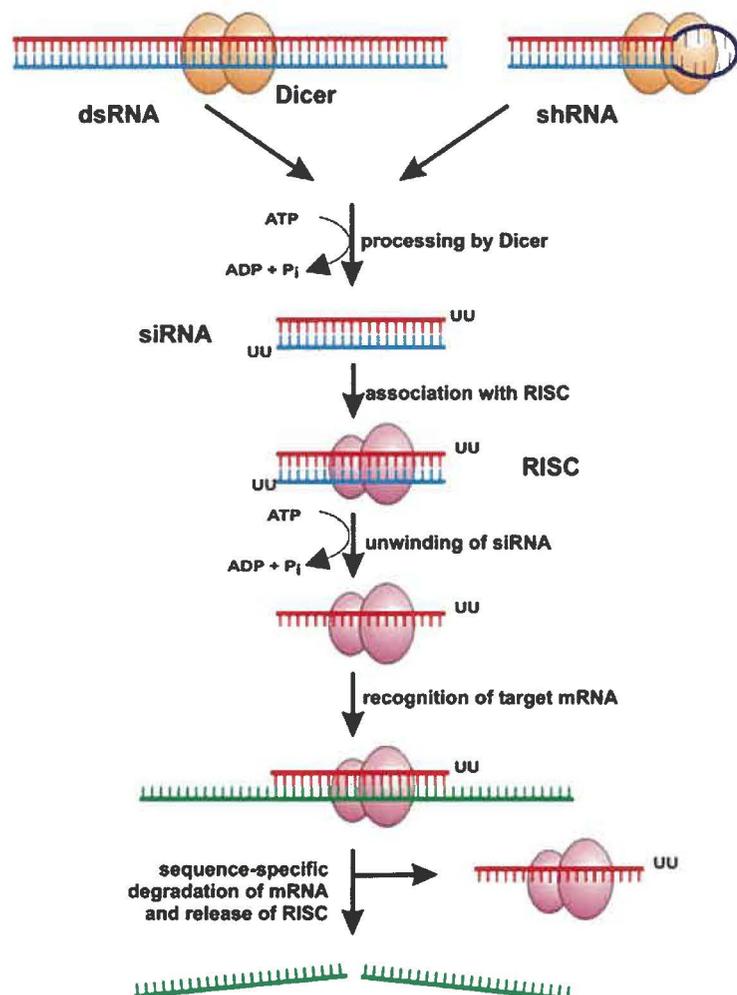


Figure 1 : Résumé des mécanismes moléculaires de l'ARN interférence (ARNi) à partir d'un ARN en tête d'épingle (shRNA) ou d'un ARN double brin (dsRNA). Tiré de Rutz et Scheffold, 2004, libre accès.

De plus, la découverte d'un complexe de «répression d'initiation de transcription induite par ARN » (« RNA-Induced initiation of Transcriptional gene Silencing », ou RITS) dans la levure *Schizosaccharomyces pombe*, qui cible le gène sur l'ADN correspondant au siRNA inclus dans le complexe pour induire la formation d'hétérochromatine et ainsi réprimer la transcription de ce gène (Verdel *et al.*, 2004), suggère qu'un deuxième mécanisme de répression siRNA-dépendant existe. Les diverses fonctions du RITS dans *S. pombe* (et quelques autres

organismes) sont décrites dans Grewal, 2010; il n'est pas exclu que des mécanismes semblables au RITS existent chez les eucaryotes supérieures.

1.5.2. Induction d'ARNi dans des lignées cellulaires

La méthode la plus simple pour induire une ARN interférence dans des cultures cellulaires est le simple ajout de siRNA synthétiques conçus pour cibler un ARNm spécifique (dont le brin guide est anti-sens à une portion du transcrit ciblé). Or, les membranes cellulaires étant imperméables aux acides nucléiques chargés négativement, et puisqu'il n'y a pas de mécanisme de transport des acides nucléiques, la simple exposition de cellules à des siRNA ne suffit pas à provoquer une répression d'un gène. Plusieurs agents de transfection, tous étant des lipides et/ou des polymères cationiques, ont été conçus pour l'entrée d'acides nucléiques dans des cellules (Felgner *et al.*, 1997; Rozema et Lewis, 2003). Or, la transfection de siRNA n'a qu'un effet transitoire; la division cellulaire et la demi-vie biologique des siRNA diluent graduellement l'effet répressif qui ne durera que quelques jours. De plus, l'effet de l'ARN interférence apparaît avec un délai plus ou moins long, dépendamment de la demi-vie biologique de la protéine à réprimer.

Des plasmides exprimant des siRNA ou un shRNA ciblant un gène voulu, et contenant un gène de sélection peuvent également être transfectés en utilisant des agents cationiques ou par électroporation. Il en résulte une répression spécifique et durable du gène ciblé (Brumellkamp *et al.*, 2002; Paddison *et al.*, 2002). Néanmoins, si une pression sélective n'est pas maintenue par l'usage continu de l'antibiotique de sélection, il y a des risques de perte graduelle du plasmide à long terme. De plus, certains types de cellules sont réfractaires à la transfection, et l'usage alternatif de l'électroporation, quoiqu'efficace, tue une large proportion des cellules subissant la procédure (McManus *et al.*, 2002).

Une autre alternative est l'utilisation de vecteurs viraux, dont il existe plusieurs modèles différents. Le point commun de ces vecteurs est une infection par un virus dont le matériel génétique est artificiellement modifié pour porter un

siRNA/shRNA (ainsi qu'un gène de sélection) contre une cible donnée, et si besoin est, pour rendre le virus inoffensif. Parmi ceux-ci, les adénovirus (AdV) ont un génome d'ADN double brin et sont capables d'infecter autant les cellules en division que quiescentes. Ce virus est communément utilisé comme vecteur *in vitro*, et 25% des essais cliniques de thérapies géniques à base de virus utilisent des adénovirus (Relph *et al.*, 2005). Par contre, les récepteurs de surface ciblés par les protéines de capsid de ces virus ne sont pas toujours exprimés dans les tissus d'intérêt, et peu dans les cellules cancéreuses (Sliva et Schnierle, 2010). De plus, l'ADN des adénovirus ne s'intègre pas dans le génome de l'hôte; les siRNA/shRNA insérés de cette façon dans les cellules hôtes peuvent se perdre au cours de divisions répétées, ce qui ne permet pas l'établissement de lignées stables.

Une autre famille de virus fréquemment utilisée pour l'introduction de siRNA/shRNA est celle des rétrovirus. Ces derniers ont comme caractéristique d'être des virus à ARN (leur génome est constitué d'ARN linéaire) et ayant une enveloppe virale. Tous les rétrovirus portent au moins 3 gènes : *gag* (protéine constituant la capsid), *pol* (la transcriptase inverse virale) et *env* (protéine d'enveloppe virale). À chaque extrémité de leur génome, il y a de « longues répétitions terminales » (« long terminal repeats » ou LTR), contenant des promoteurs de transcription et, surtout, les séquences nécessaires à l'intégration dans le génome de l'hôte. En effet, suite à l'infection d'une cellule-hôte, l'ARN viral est rétro-transcrit en ADN, puis intégré aléatoirement au génome de l'hôte par le biais des LTR. Le tropisme de ces virus pour un type de cellule donnée dépend de la protéine d'enveloppe Env. Contrairement aux adénovirus (sans enveloppe), il est possible d'artificiellement changer de protéine d'enveloppe; la modification/changement de la protéine d'enveloppe des rétrovirus (pseudotypage) permet de choisir quel(s) type(s) de cellules le virus ciblera (Haynes *et al.*, 2003). Par exemple, l'usage de la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSVG) comme protéine d'enveloppe permet le ciblage d'une vaste gamme d'espèce (mammifères, poissons, etc.) et d'obtenir de hautes concentrations

(titres) de virus (Burns *et al.*, 1993). Au contraire, l'utilisation des petits et grands antigènes de surface du virus de l'hépatite B permet de cibler précisément les hépatocytes humains (Sung et Lai, 2002). Une fois le virus constitué par des cellules-hôtes, le ciblage, l'entrée et l'intégration du génome ne nécessitent pas de synthèse de protéines virales. Par conséquent, tous les gènes contenus dans le vecteur rétroviral sont accessoires, et peuvent être remplacés par les gènes ou séquences de notre choix (encadrés par des LTR).

1.5.3 Vecteurs lentiviraux

Les lentivirus sont une sous-classe de rétrovirus. Un des avantages des lentivirus est qu'ils sont capables d'infecter autant des cellules en division que « quiescentes », alors que les rétrovirus n'infectent que les cellules en division (Wiznerowicz et Trono, 2005). De plus, les lentivirus peuvent encapsider plus de matériel génétique que la plupart des rétrovirus. Parmi les différentes souches de lentivirus, les plus connues sont les virus d'immunodéficiences de différentes espèces (simien, bovin, félin, etc), notamment celui de l'humain (VIH). Ainsi, puisque les lentivirus natifs causent ou peuvent causer de graves maladies chez l'humain ou chez d'autres espèces, leur utilisation comme vecteur est conditionnel à quelques précautions. D'abord, les vecteurs lentiviraux sont non-réplicatifs (aucun gène viral n'est intégré dans la cellule-hôte, seulement le contenu désiré). Ensuite, des cellules productrices, utilisées comme intermédiaires, sont transfectées avec différents plasmides contenant chacun un des gènes essentiels à la constitution de virus, plus le matériel génétique à encapsider (séquence shRNA et gène de résistance antibiotique entre 2 LTR, par exemple), ce qui sépare les différents constituants. Dans ce processus, puisque l'on veut potentiellement cibler plusieurs types cellulaires, l'utilisation d'une protéine de capsid ubiquitaire (tel que VSVG) en remplacement du gène *env* est de mise. Il ne reste plus qu'à récolter et filtrer le milieu de culture des cellules productrices, riche en virus, pour ensuite l'utiliser pour infecter les lignées cellulaires de notre choix. La résultante est un vecteur viral non-réplicatif et sécuritaire, capable de cibler tous les types cellulaires et capable d'introduire et d'intégrer très

efficacement et en permanence les séquences et gènes de sélection voulus. Ces caractéristiques expliquent pourquoi plusieurs compagnies offrent les vecteurs lentiviraux comme moyen d'introduire des shRNA. D'ailleurs, une banque de shRNA ciblant la majeure partie des gènes de l'humain et de la souris (entre autres) sont disponibles sur le marché et dans les milieux académiques.

Pour le projet en cours, un système à 4 plasmides d'ADN (les 3 premiers de la compagnie InVitrogen) permet la constitution du virus. Ainsi, le plasmide pLP1 contient les gènes *gag* et *pol*, mais sous contrôle en amont par un « élément de réponse à *rev* » (« *rev* response element » ou RRE). Le gène lentiviral *rev* est situé sur un deuxième plasmide (pLP2), et son expression permet d'activer la transcription des gènes sous contrôle du RRE. Un troisième plasmide (VSV-G) permet la synthèse de la protéine d'enveloppe VSVG. Un quatrième plasmide, cette fois provenant de la banque de shRNA dans des plasmides lentiviraux de la série pLKO de la compagnie Sigma Aldrich, fournira le matériel à encapsider (le shRNA et la résistance à l'antibiotique). Dans le cas présent, le shRNA est conçu pour cibler le récepteur d'œstrogène α ($ER\alpha$) murin. Ces 4 plasmides ont été transfectés en même temps dans la lignée cellulaire productrice de virus 293T, les lentivirus ainsi produits ont été utilisés pour infecter les lignées murines MC7-L1 et MC4-L2 dans le but de réprimer l'expression d' $ER\alpha$ et de créer les lignées MC7-L1 et MC4-L2 $ER\alpha$ -Knockdown ($ER\alpha$ KD). La figure 2 schématise les processus de fabrication de virus et l'infection virale.

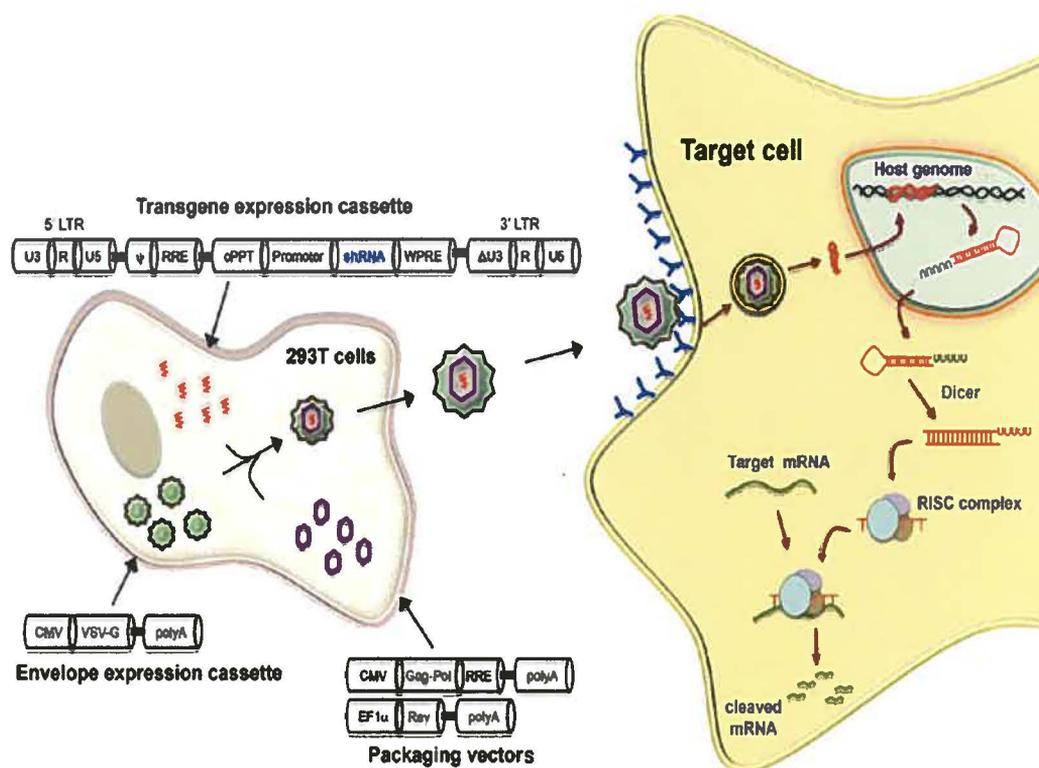


Figure 2 : Production de lentivirus porteurs d'une cassette d'expression de shRNA par une cellule productrice 293T, et infection d'une cellule-hôte. Le génome de l'hôte incorpore la cassette contenant le shRNA et une résistance à un agent de sélection. Les shRNA ainsi produits sont découpés en siRNA par l'enzyme Dicer, puis les siRNA sont introduits dans le complexe RISC, qui se servira du brin guide du siRNA pour reconnaître et cliver les ARNm ciblés. Tiré de Manjunath *et al.*, 2009.

1.6. Agonistes et antagonistes des ER

Les hormones stéroïdiennes comportent une vaste gamme de molécules dérivés du cholestérol et naturellement produites par le corps humain, incluant les progestines, les corticoïdes, les androgènes et les œstrogènes. De ces quatre classes, seules les corticoïdes ne sont pas des hormones sexuelles. La voie biochimique de synthèse des hormones stéroïdiennes a comme point de départ le cholestérol. La figure 3 résume les étapes de cette voie métabolique. En particulier, la synthèse des œstrogènes découle directement de l'action de

l'enzyme cytochrome P450 aromatasase (le gène CYP19) sur les substrats androstènedione (converti en estrone) et testostérone (converti en estradiol).

Voici donc un descriptif de l'agoniste principal des ER, l'estradiol, ainsi que des différentes hormonothérapies impliquées dans les projets de la présente thèse (figure 4).

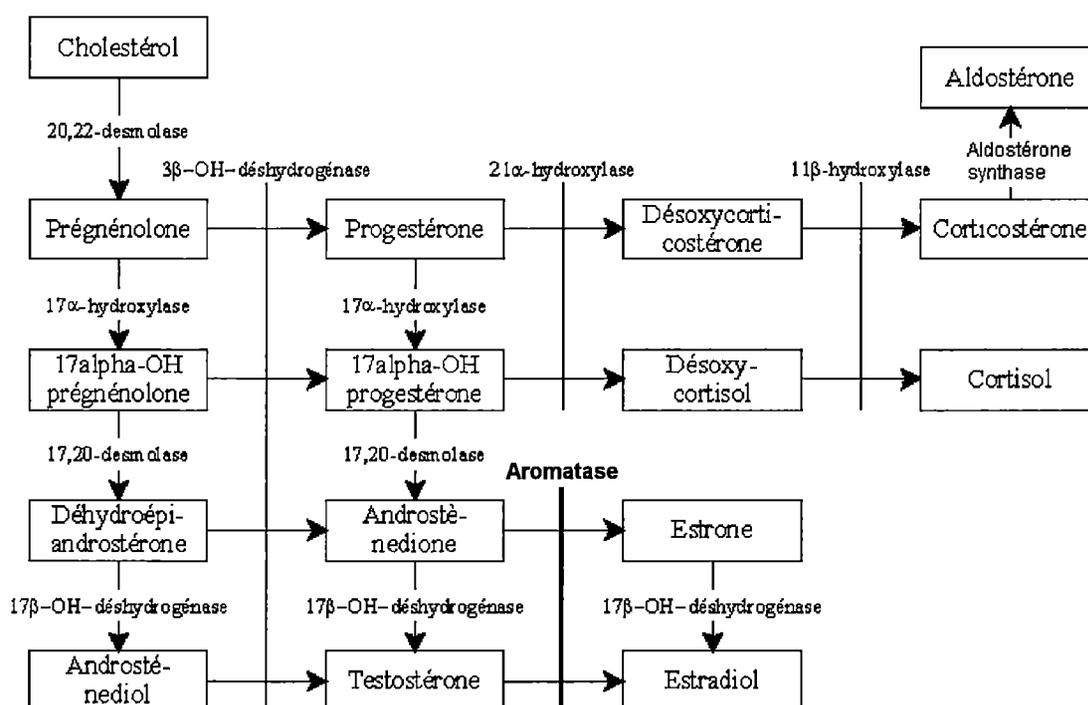


Figure 3 : Voie biochimique de la synthèse des hormones stéroïdiennes.

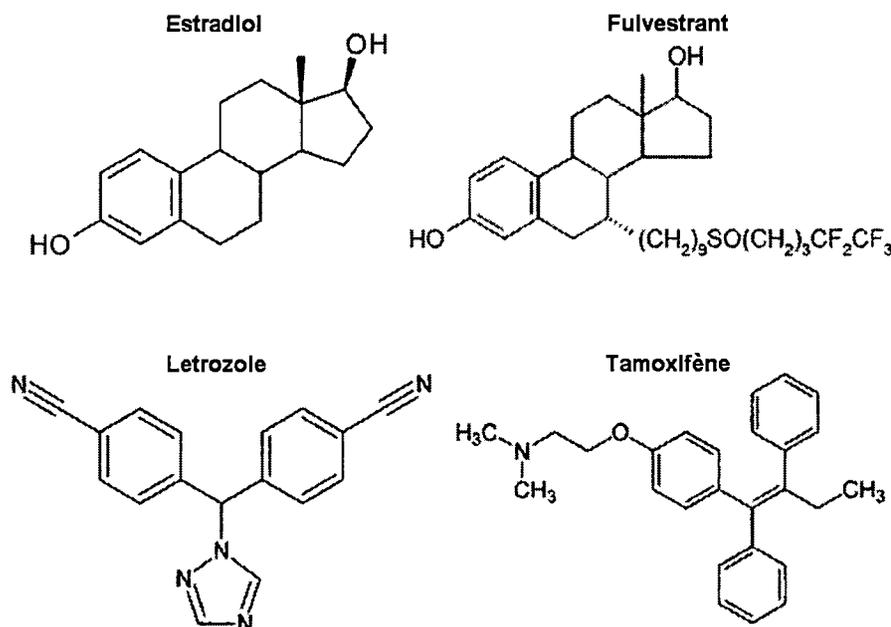


Figure 4 : Structures chimiques de l'estradiol, ainsi que des agents d'hormonothérapie fulvestrant, letrozole et tamoxifène.

1.6.1. Estradiol

L'estradiol est l'hormone stéroïdienne naturelle ayant le plus d'affinité avec les récepteurs d'œstrogène; il en est un puissant agoniste. Ainsi, cette hormone a une constante de dissociation (K_d) de 0,2 nM pour ER α et 0,5 nM pour ER β chez la souris (Tremblay *et al.*, 1997), et de 0,05 nM pour ER α et 0,09 nM pour ER β chez l'humain (Kuiper *et al.*, 1998). L'estradiol est une molécule à 4 cycles, dérivée du cholestérol, avec un groupement hydroxy en position 3 (sur le cycle benzénique), et un autre en 17 β (sur le cyclopentane).

La majorité de l'estradiol circulante se lie fortement à la globuline SHBG («Sex Hormone Binding Globulin») et à l'albumine (avec une plus faible affinité), tandis qu'une partie minoritaire reste sous forme libre. L'estradiol lié devra se dissocier de ces protéines plasmatiques pour pouvoir entrer dans la cellule et se lier aux récepteurs d'œstrogène, localisés dans le noyau. Plusieurs mécanismes impliquant des récepteurs de SHBG ont été décrits pour l'apport d'estradiol aux cellules (Strel'chyonok et Avvakumov, 1990; Hryb *et al.*, 1990). Aussi, SHBG aurait comme rôle de solubiliser et de protéger les hormones stéroïdiennes contre

le métabolisme (Tait et Tait, 1991). Les avis quant à l'importance de SHBG pour la distribution et l'apport des estrogènes sont partagés. Néanmoins, les rongeurs tels que la souris ne produisent pas de SHBG; il faut tenir compte de ce facteur pour les expérimentations animales. Il n'y a pas de transport transmembranaire de l'estradiol (et de l'ensemble des stéroïdes en fait) : son hydrophobicité lui permet de traverser librement les membranes cellulaires.

Chez la femme préménopausée, les ovaires sont les principaux organes de synthèse et de sécrétion de l'estradiol, qui est relâché dans la circulation où il agit de manière systémique (endocrine). Chez l'homme, une fraction des androgènes sont convertis en œstrogènes par les gonades; la synthèse, l'activité et le métabolisme de l'estradiol sont réservés à certains tissus spécifiques (activité paracrine et autocrine). À la ménopause, les taux d'estradiol circulants des femmes chutent drastiquement (sous les niveaux circulant chez les mâles), et la majeure partie des œstrogènes et des androgènes sont alors synthétisés localement dans des tissus spécifiques (Simpson *et al.*, 2005).

Les rôles physiologiques de l'estradiol chez la femme sont surtout d'amorcer la maturité sexuelle à la puberté et de contribuer à réguler le cycle reproducteur tout au long de la vie pré-ménopause. Notamment, les œstrogènes jouent un rôle important dans le développement et le maintien des os chez les deux sexes. Ainsi, des souris ayant une délétion du gène de l'aromatase (et donc incapables de synthétiser des œstrogènes) sont infertiles (Fisher *et al.*, 1998) et ont une perte de masse osseuse, autant chez les mâles que chez les femelles (Oz *et al.*, 2000). De plus, ces mutants de délétion présentent des syndromes métaboliques, tels que de la résistance à l'insuline, de l'obésité troncale et de la stéatose hépatique (Jones *et al.*, 2000). En clinique, une dizaine de cas déficients en aromatase (dont 2 hommes) ont été rapportés. À la puberté, une absence de maturité sexuelle est survenue chez les femmes (aménorrhée, pas de développement mammaire, ovaires kystiques, etc.) qui a graduellement été inversée par supplémentation en estradiol. Un de ces cas est présenté dans Conte *et al.*, 1994. Les 2 hommes ont

quant à eux développé une taille (croissance) excessive vers la fin de de la vingtaine due à une absence de fusion d'épiphyse osseuse, ainsi qu'une obésité ventrale (entre autre); une supplémentation en estradiol a densifié les extrémités osseuses, arrêté la croissance et renversé les autres symptômes (Carani *et al.* 1997; Morishima *et al.*, 1995).

Plusieurs types de cancer expriment de fortes quantités d'aromatase, dont les carcinomes de l'endomètre, les carcinomes hépatocellulaires et les adénocarcinomes mammaires. Pour les cancers du sein, un gradient d'expression de l'aromatase (et de production locale d'œstrogènes) avec la tumeur comme point focal peut être observé (Zhou *et al.*, 1997). Cette surexpression de l'aromatase dans les lésions mammaires explique en grande partie comment les tumeurs ER+, pourtant très fréquentes parmi les patientes ménopausées, peuvent proliférer dans un environnement très pauvre en estradiol circulant.

1.6.2. Tamoxifène

Un dérivé des premiers antioestrogènes non-stéroïdiens (comme le MER-25 et le clomiphène; Lerner, 1964), le tamoxifène est un triphényléthylène membre de la classe d'hormonothérapie des « modulateurs sélectifs des récepteurs d'œstrogène » (SERM). Cet agoniste partiel des récepteurs d'œstrogène est le traitement le plus utilisé pour les cancers du sein ER+. Son mode d'action est ambigu selon les tissus ciblés: s'il inhibe la signalisation des ER dans les tumeurs mammaires ER+, il a un effet semblable à l'estradiol dans les os, le système cardiovasculaire, le métabolisme lipidique et l'endomètre (Fitzpatrick, 1999). Plus précisément, le tamoxifène induit un changement de conformation empêchant l'attachement de co-activateurs et bloque ainsi la transcription dépendante du domaine AF2 (ligand-dépendant) d'ER α (Shiau *et al.*, 1998). Par contre, le tamoxifène peut agir comme agoniste sur les gènes dont la transcription est dépendante de AF1 (McDonnel *et al.*, 1995). Aussi, le tamoxifène agit comme agoniste sur la forme localisée à la membrane d'ER α (Schiff *et al.*, 2004). Outre son activité d'agoniste partiel, il est aussi un inhibiteur de la synthèse du

cholestérol (inhibe la conversion du $\Delta 8$ -cholesténol en lathostérol), et ainsi diminue le taux de LDL et altère le métabolisme des lipides (Love *et al.*, 1995; Gylling *et al.*, 1995).

De plus, le tamoxifène est métabolisé en N-desméthyltamoxifène par l'enzyme CYP3A4/5 et en 4-hydroxy-tamoxifène (4-OHT) par l'enzyme CYP2D6, ce dernier ayant une haute activité antiestrogénique (Jordan *et al.*, 1977), mais une plus courte demi-vie biologique (Jordan et Allen, 1980).

En clinique, le tamoxifène a été considéré comme augmentant la survie globale des patientes atteintes d'un cancer du sein à court et à long terme (Early Breast Cancer Trialist Collaborative Group (EBCTCG), 1992; EBCTCG, 1998; EBCTCG, 2005). Malgré que le tamoxifène puisse induire ou stimuler des cancers de l'endomètre, il a été déterminé que les bénéfices entourant l'usage de cette thérapie surpassaient largement les risques encourus (revu dans Clarke, 2006).

1.6.2. Fulvestrant

Le fulvestrant (ICI 182.780) est utilisé dans une thérapie endocrine pour le cancer du sein, avec une structure et un mode d'action unique. Il consiste en une molécule d'estradiol portant en 7α une longue chaîne alkyle-sulphinyl dont les 2 derniers carbones sont saturés en fluor. Étant un antagoniste pur, il s'attache de manière compétitive au récepteur d'œstrogène avec une grande affinité ($IC_{50} = 9.4$ nM pour les ER de l'utérus de rat; Wakeling *et al.*, 1991), et diminue l'expression des récepteurs d'œstrogène par inhibition complète de la signalisation dépendante des œstrogènes, et par l'augmentation de la dégradation de ces récepteurs (Johnston et Cheung, 2010). Plus précisément, le fulvestrant inhibe la dimérisation (Parker, 1993) et les fonctions d'activation AF1 et AF2 des ER (Webb *et al.*, 2003), et réduit la translocation des ER vers le noyau tout en favorisant la dégradation des récepteurs d'œstrogène par ubiquitination et entrée dans le protéasome (Wijayarathne et McDonnell, 2001), réduisant ainsi à la fois la quantité d'ER et son activité globale (Howell *et al.*, 2000). Il n'a aucune activité agoniste (Wakeling *et*

al., 1991), et a la capacité de complètement bloquer l'effet trophique de l'estradiol sur les organes cibles, dont l'utérus (Dukes *et al.*, 1993). Aussi, le fulvestrant bloque également l'activation des ER par des récepteurs de facteurs de croissance tels que EGFR et ErbB2, sans pour autant inhiber les principales voies de signalisations de ces derniers (Howell, 2006).

Cette thérapie est actuellement utilisée en clinique pour des cancers du sein ER+ (traitement principal ou adjuvant), ou dans des cas de cancer avancé qui ont auparavant progressé avec d'autres hormonothérapies (Bertelli et Paridaens, 2006). Une étude clinique de phase III a démontré que des tumeurs devenues résistantes au tamoxifène demeurent sensibles au fulvestrant (Osborne *et al.*, 2002). Une autre étude a montré que 30% des patientes étudiées dont les lésions ont recommencé à progresser sous traitement aux inhibiteurs d'aromatase ont obtenu un bénéfice clinique avec le fulvestrant (Perey *et al.*, 2007).

1.6.4. Letrozole

La première thérapie hormonale contre un carcinome mammaire métastatique a été effectuée au XIXe siècle par ovariectomie bilatérale; une régression tumorale avait alors été observée (Beatson, 1896). Depuis, des méthodes moins invasives, notamment pharmacologiques, ont été développées pour abolir la synthèse d'oestrogènes chez les patientes atteintes d'un cancer du sein.

Entre autres, le letrozole, un dérivé de triazole, est un inhibiteur réversible non-stéroïdien de troisième génération de l'enzyme cytochrome P450 aromatase, d'où le nom de cette classe de médicament (inhibiteur d'aromatase). Pour exercer sa fonction, il s'attache à la portion cytochrome P450 de l'enzyme (Lonning et Geisler, 2008). Or, l'aromatase est l'enzyme responsable de la conversion de l'androstènedione et de la testostérone (2 androgènes) en estrone et en estradiol, respectivement; la synthèse des œstrogènes passe obligatoirement par cette enzyme. Puisque les tumeurs mammaires hormonodépendantes nécessitent un

stimulus œstrogénique pour croître/survivre, ce médicament permet d'affamer ces tumeurs en œstrogènes. En effet, le letrozole abaisse les niveaux plasmiqes d'œstradiol de 85 à 92% et inhibe presque entièrement la synthèse intratumorale d'œstrogène (Geisler *et al.*, 2002). Néanmoins, le letrozole n'est pas indiqué pour les patientes préménopausées, car il est d'une efficacité limitée contre l'aromatase ovarienne et une carence d'œstrogène systémique peut engendrer une stimulation gonadotrope (Sinha *et al.*, 1998). Deux études cliniques où des biopsies de tumeurs mammaires ont été prélevées avant et 2 semaines après un traitement au letrozole ont montré par puce d'ADN d'importants changements dans les patrons d'expression de gènes de ces lésions (Miller *et al.*, 2007; Mackay *et al.*, 2007). Ainsi, des gènes dépendants des ER et des gènes de prolifération ont été réprimés par le traitement au letrozole, alors qu'un tel traitement semble augmenter l'expression de gènes de structure, d'adhésion et de réponse immunitaire. À plus long terme (3 à 4 mois), un plus grand éventail de gènes dans les tumeurs est influencé par un apport en letrozole, incluant entre autre une répression de gènes de cycle cellulaire et de métabolisme (revu dans Miller et Larionov, 2011). Enfin, le letrozole semble être supérieur au tamoxifène pour le traitement en première ligne de tumeurs ER+/PR+ pour ce qui est du temps avant la progression, du taux de réponse objectif et du temps sans symptôme ni toxicité (Riemsma *et al.*, 2010).

1.7. Imagerie en tomographie d'émission par positrons (TEP)

Il existe plusieurs modalités d'imagerie en médecine. Certaines sont décrites comme étant anatomiques (tels que la tomodensitométrie (TDM) et l'imagerie par résonance magnétique), d'autres sont fonctionnelles et/ou moléculaires (tels que la tomographie d'émission monophotonique (TEM) et la tomographie d'émission par positrons; TEP). Puisque les travaux présentés en cette thèse ont nécessité exclusivement l'utilisation de la TEP, cette dernière sera décrite plus en détails.

1.7.1. Principes de la TEP

Tout comme son nom l'indique, la tomographie d'émission par positrons s'appuie sur la détection de radionucléides émettant des positrons (et des molécules associées). Le positron (e^+) est l'antiparticule de l'électron (e^-) : ils ont tous deux la même masse (511 keV, ou $9,11 \times 10^{-31}$ kg), mais ont des charges opposées (positive pour le positron). Lorsqu'un isotope émet des positrons (on parle alors d'émission de particules β^+), ces derniers ont une certaine énergie cinétique qui se dissipera au fur et à mesure que la particule β^+ interagit avec le milieu. Jusqu'au moment où son énergie cinétique s'approche de 0, où les chances de former un complexe positronium avec un électron de la matière seront augmentées. Ce complexe, très instable, mène à une réaction d'annihilation, où l'entière masse des 2 particules sera convertie en 2 photons d'annihilation de 511 keV émis simultanément en directions opposées. Selon l'énergie cinétique résiduelle de la particule β^+ lors de l'annihilation, une légère incertitude sur l'angle de 180° sera induite par conservation de mouvement (de l'ordre de $\pm 0,25^\circ$). Ainsi, l'énergie de la particule β^+ émise (chaque isotope ayant une énergie d'émission maximale et moyenne) déterminera la distance moyenne que franchira le positron avant de s'annihiler.

Ainsi, l'imagerie TEP utilise un anneau de détecteurs configurés pour détecter des événements en coïncidence. Lorsqu'un sujet placé au centre de cet anneau est injecté avec une molécule marquée à l'aide d'un isotope émetteur de positrons, l'ensemble des coïncidences détectées (formant alors autant de lignes de réponse) sera représentatif de la distribution de cette molécule dans l'organisme. Les données ainsi compilées pourront être traitées (reconstruites) par des ordinateurs, selon le type d'information demandé. Ainsi, il est possible de soit obtenir un découpage temporel (à notre guise) de l'acquisition TEP, soit de sommer les données dans le temps pour obtenir une image statique. Le découpage temporel a comme avantage de pouvoir visualiser et analyser la distribution du traceur à la fois dans le temps et l'espace. Ainsi, plus les tranches de temps sont courtes, meilleure est la résolution en temps, mais de moins bonnes

qualités seront les images, car il y aura moins d'événements par tranches. De même, les images statiques offrent la meilleure qualité d'image (car tous les événements de l'acquisition sont sommés), mais ne donne aucune information sur l'évolution du traceur dans le temps. Dans les deux cas, la résultante est une représentation fidèle et sensible de la distribution du traceur, en trois dimensions.

Une des principales qualités de l'imagerie TEP par rapport à d'autres modalités est sa très grande sensibilité. Cette dernière est due principalement au fait que la détection se faisant en coïncidence, et dans une fenêtre d'énergie optimisée pour les photons d'annihilation, le bruit de fond est considérablement réduit, car le rayonnement extérieur résiduel ou de contamination a très peu de chances de mener à un événement.

1.7.2. Isotopes utilisés en TEP

Tous les isotopes émetteurs de positrons ont un point en commun : ils ont un déficit de neutrons par rapport à l'isotope (ou aux isotopes) stable(s) du même élément. L'instabilité du noyau qui en découle engendre une réaction de type ($p \rightarrow n$), où un proton est converti en un neutron, relâchant du même coup un positron (β^+) et un neutrino (ν_e). La résultante est la transmutation de l'isotope émetteur de positrons vers l'élément précédant du tableau périodique, avec conservation du nombre de nucléons (un proton en moins, mais un neutron en plus). Par exemple, l'azote-13 (^{13}N , ayant un neutron de moins que le ^{14}N , stable) est transmuté suite à l'émission du β^+ en carbone-13 (^{13}C , stable).

En théorie, tous les isotopes émetteurs de positrons pourraient être utilisés en imagerie TEP. Néanmoins, plusieurs facteurs d'ordre pratique limitent la liste d'isotopes utilisés. D'abord, la demi-vie de l'isotope doit permettre sinon l'expédition vers des centres d'imagerie distants du cyclotron, au moins de pouvoir être utilisé localement. Ensuite, l'isotope doit soit pouvoir représenter un processus physiologique par lui-même (comme le rubidium-82 pour la perfusion cardiaque et

les tumeurs cérébrales), soit être facilement couplé à une molécule d'intérêt physiologique. La très forte majorité des traceurs TEP entrent dans cette dernière catégorie, et des milliers de molécules ciblant des voies métaboliques, des voies de signalisation, des récepteurs, etc., ont été marqués avec succès avec l'un des isotopes émetteurs de positrons.

Les isotopes les plus utilisées dans la composition des traceurs TEP sont le carbone-11 (^{11}C), l'azote-13 (^{13}N), le fluor-18 (^{18}F), le cuivre-64 (^{64}Cu), le gallium-68 (^{68}Ga) et l'iode-124 (^{124}I). Le marquage au ^{11}C ou au ^{13}N donne des traceurs étant des copies conformes de leurs équivalents non radioactifs, alors que le marquage au ^{18}F ou au ^{124}I mène à la formation de dérivés halogénés qui peuvent avoir des propriétés différentes de la molécule-mère. Les radio-métaux anioniques tels que le ^{64}Cu et le ^{68}Ga nécessite quant à eux un groupement chélateur attaché à la molécule d'intérêt pour pouvoir s'attacher au traceur. Au cours de ce projet, seuls le carbone-11 et le fluor-18 ont été utilisés pour marquer les différents traceurs utilisés. Le carbone-11 est un isotope ayant une demi-vie de 20,3 minutes dont l'énergie moyenne du positron est de 390 keV (portée moyenne de 0,19 mm dans l'eau) (Phelps *et al.*, 1975; Levin et Hoffman, 1998). Quant au fluor-18, sa demi-vie est de 110 minutes et l'énergie moyenne de son positron est de 250 keV, qui parcourt en moyenne 0,1 mm dans l'eau (Cho *et al.*, 1975; Levin et Hoffman, 1998).

1.8. Traceurs TEP utilisés

Afin de visualiser divers paramètres chez l'animal porteur de tumeurs, tels que le métabolisme du glucose ou des protéines, la teneur relative en récepteurs d'oestrogène et le taux de prolifération, la présente étude a nécessité l'utilisation de différents traceurs TEP. Chacun ayant des caractéristiques et une utilité qui lui sont propres, il est préférable de s'y attarder un à la fois. La figure 5 montre la structure chimique des différents traceurs présentés dans cette section.

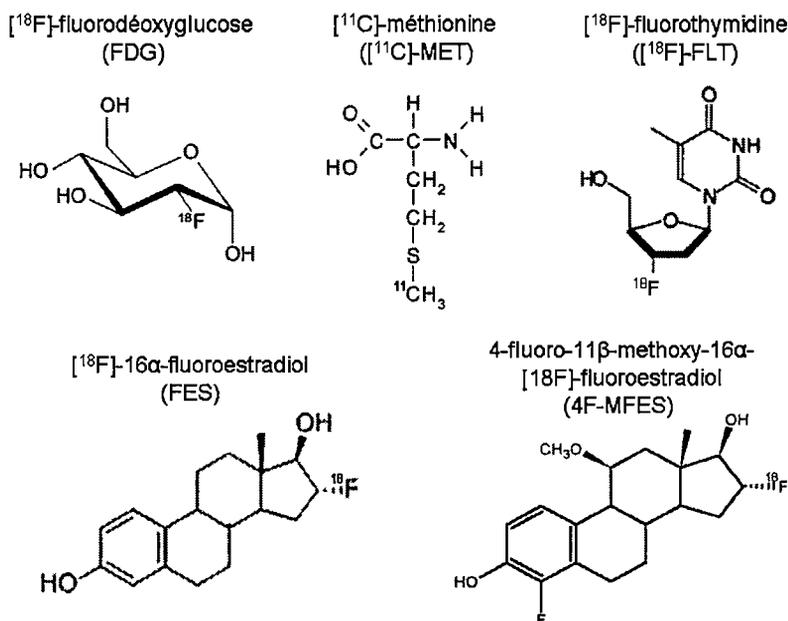


Figure 5 : Structures chimiques des différents traceurs TEP utilisés.

1.8.1. [¹⁸F]-fluorodésoxyglucose

Le [¹⁸F]-2-fluoro-2-désoxy-D-glucose, communément appelé « FDG », est une des premières molécules ayant été utilisée à grande échelle en clinique pour l'imagerie TEP. Étant un analogue du glucose, il est utilisé surtout par les cellules/tissus consommant beaucoup de glucose, comme le cerveau, le cœur, et la plupart des lésions cancéreuses. L'entrée du FDG (comme du glucose) dans les cellules cancéreuses dépend de l'activité d'un transporteur trans-membranaire de la famille GLUT (GLUT 1 et 3; Phelps *et al.*, 1979). Une fois à l'intérieur des cellules, le FDG est phosphorylé par une hexokinase pour former le FDG-6-phosphate, qui ne peut être métabolisé et qui ne peut être reconnu par les transporteurs GLUT, empêchant toute éventuelle sortie. Cette molécule est dès lors emprisonnée dans la cellule. Donc, la captation de ce radiotracer est dépendante entre autres de la présence des transporteurs GLUT et de l'hexokinase, qui sont en plus grande quantité dans les tissus nécessitant une plus grande consommation de glucose (Smith, 1998; Smith, 2001).

Le FDG est excrété majoritairement via le système urinaire, et une fois la décroissance radioactive du fluor-18 en oxygène-18 effectuée, la molécule

redevient du glucose-6-phosphate qui est métabolisé normalement. Ces 2 phénomènes (excrétion et décroissance) contribuent très majoritairement à la demi-vie biologique du radiotraceur.

En oncologie, la majorité des tumeurs malignes ont une expression accrue du transporteur GLUT1 (Pauwels *et al.*, 1998, Birnbaum *et al.*, 1987, Yamamoto *et al.*, 1990). Aussi, il a été démontré que les cellules cancéreuses ont une glycolyse accrue (et moins de gluconéogenèse) causée par une réduction d'activité du cycle de Krebs et par l'augmentation de l'activité de la transaldolase convertissant le glucose-6-phosphate en ribose-5-phosphate nécessaire à la synthèse des acides nucléiques (Weber, 1977; Weber, 2001). Néanmoins, une corrélation entre les niveaux d'hexokinase dans les tumeurs et la captation de FDG est plus difficile à déterminer. En effet, si la captation de FDG est attribuée majoritairement à l'hexokinase 1 (Bos *et al.*, 2002), les tumeurs surexpriment surtout l'hexokinase 2 (Mathupala *et al.*, 1997). Aussi, la captation de FDG est corrélée avec le nombre de cellules tumorales viables *in vitro* (Higashi *et al.*, 1993) et *in vivo* (Bos *et al.*, 2002), ainsi qu'avec l'expression de p53 (Crippa *et al.*, 1998), mais n'est pas relié avec l'expression de récepteurs hormonaux (Crippa *et al.*, 1998). L'imagerie TEP au FDG est couramment utilisée pour le diagnostic, le suivi et la classification de différents types de tumeurs.

1.8.2. [¹⁸F]-16 α -fluoroestradiol (FES)

Plusieurs molécules visant les récepteurs de l'œstrogène en imagerie TEP ont été développées au cours des 30 dernières années (Kiesewetter *et al.*, 1984; Pomper *et al.*, 1990; VanBrocklin *et al.*, 1993; Seimbille *et al.*, 2002, Ahmed *et al.*, 2009, entre autres). La plus connue, la mieux caractérisée et la plus utilisée en recherche préclinique et en clinique est le [¹⁸F]-16 α -fluoroestradiol (FES) (Kiesewetter *et al.*, 1984).

L'intérêt pour le FES comme traceur provient de sa forte capacité de lier les récepteurs d'œstrogène *in vitro*, et de sa haute affinité pour les tissus riches en

récepteurs *in vivo* (Kiesewetter *et al.*, 1984). Aussi, une forte corrélation entre la captation de FES et la concentration en récepteurs d'œstrogène a été démontrée dans plusieurs études cliniques (dont Mintun *et al.*, 1988, Dehdashti *et al.*, 1995 ainsi que Mortimer *et al.*, 1996). Ainsi, vu l'importance de la connaissance de la teneur en récepteurs d'œstrogène dans une tumeur mammaire pour le pronostic et le traitement, la TEP au FES s'avère une alternative avantageuse à la biopsie, particulièrement lors de métastases. Aussi, le FES a été utilisé récemment pour suivre la modulation des récepteurs d'œstrogène avant et après un traitement avec différentes hormonothérapies (Linden *et al.*, 2011). Bien qu'on ait observé une diminution marquée de la captation tumorale de FES lors de traitement au fulvestrant et au tamoxifène, ils n'ont pas pu distinguer si cette réduction de la captation était due à une diminution de l'expression des ER, ou bien à une compétition pharmacologique entre les traitements et le radiotracer.

Or, la TEP au FES n'a pas pu s'établir de manière ubiquitaire compte tenu de son coût élevé, de sa disponibilité clinique limitée, incluant l'expertise qui doit y être associée (Kumar, 2007). Sans compter que le FES est métabolisé rapidement (surtout par le foie), créant ainsi des radiométabolites résiduels qui réduisent l'affinité (par compétition) aux sites ER⁺ (Kumar, 2007) et augmentent le bruit de fond des images TEP. Les principaux métabolites du FES sont des conjugués sulfates et glucuronidates du FES, tous plus polaires et chargés que le FES (Mankoff *et al.*, 1997). Outre les tissus riches en récepteurs d'œstrogène, le FES s'accumule en majeure partie dans le foie (surtout la vésicule biliaire) et le tractus intestinal; les métabolites résultant du métabolisme hépatique sont éliminés par la bile.

1.8.3. 4-fluoro-11 β -méthoxy-16 α -[¹⁸F]-fluoroestradiol (4FMFES)

Le 4-fluoro-11 β -méthoxy-16 α -[¹⁸F]-fluoroestradiol (4FMFES) a été synthétisé pour la première fois en 2001 par le groupe du Dr Johan E. van Lier à Sherbrooke (Seimbille *et al.*, 2001; Seimbille *et al.*, 2002). Il est le dérivé d'un traceur TEM iodé précédemment évalué en clinique, le 11 β -méthoxy-(17 α ,20)-

[¹²³I]iodovinylestradiol (MIVE) (Nachar *et al.*, 1999). L'ajout d'un groupe 11 β -éthyl à une molécule d'estradiol améliore le ratio cible/non-cible (Ali *et al.*, 1993), alors que l'ajout d'un fluor en position 2 ou 4 devrait ralentir le métabolisme *in vivo* (Seimbille *et al.*, 2002). Par conséquent, des études *ex vivo* ont démontré que le 4FMFES présentait un meilleur ratio utérus/non-cible chez le rat et un meilleur ratio tumeur/plasma et tumeur/muscle chez la souris (Seimbille *et al.*, 2002; Bénard *et al.*, 2008). Une étude clinique de phase I a détaillé la dosimétrie de ce traceur chez des femmes en santé; la captation utérine et le ratio utérus/tissu non-spécifique y étaient supérieurs à ceux du FES (Beauregard *et al.*, 2009). L'organe critique de dosimétrie est le foie (vésicule biliaire): la voie d'élimination du 4FMFES est identique à celle du FES.

Aucune image TEP au 4F-MFES de tumeurs n'avait été publiée chez l'animal ou en clinique auparavant. Une étude clinique de phase 2 visant à comparer l'imagerie au FES avec celle du 4FMFES chez des patientes atteintes de cancer du sein est en cours, et les résultats préliminaires indiquent un contraste tumoral nettement supérieur du 4FMFES par rapport au FES. La synthèse et l'usage de ce traceur sont pour l'instant anecdotiques et sont exclusifs au Centre d'Imagerie Moléculaire de Sherbrooke.

1.8.4. [¹¹C]-méthionine ([¹¹C]-MET)

La [¹¹C]-méthionine est un traceur TEP en tout point identique à l'acide aminé du même nom (à l'exception de l'isotope ¹¹C, placé dans le méthyl s'attachant au soufre). Par conséquent, sa distribution *in vivo* et la captation/incorporation cellulaire sont identiques à ceux de la méthionine. L'entrée de ce traceur à l'intérieur des cellules cibles de la méthionine est due majoritairement au système de transport des acides aminés L (indépendant du sodium), ainsi que des contributions des systèmes de transport A et ASC, tous deux dépendants du sodium (Souba et Pacitti, 1992; Shotwell *et al.*, 1981). Le système de transport A est fortement exprimé dans les cellules malignes (Saier *et al.*, 1988), ce qui peut contribuer à la captation préférentielle de la méthionine par les tumeurs en comparaison de la plupart des autres tissus. Ainsi, la captation de

[¹¹C]-méthionine dans des carcinomes pulmonaires a été rapportée être reliée en majeure partie au transport accru des acides aminés (Miyazawa *et al.*, 1993). Néanmoins, il est aussi suggéré que l'augmentation du transport des acides aminés dans les cellules tumorales soit le résultat d'un besoin net et non-spécifique en acides aminés, résultant d'un métabolisme général élevé et d'une synthèse protéique accrue (Jager *et al.*, 2001).

La captation de [¹¹C]-méthionine reflète le taux de synthèse protéique et le transport en acides aminés d'un tissu donné, mais donne aussi un indice quant au taux de prolifération. En effet, la synthèse protéique est à son maximum pendant la phase S de la division cellulaire. Par conséquent, une certaine corrélation entre la captation de [¹¹C]-MET et l'indice immunohistologique de prolifération Ki67 (Hatakeyama *et al.*, 2008), l'indice immunohistologique de prolifération PCNA (Sato *et al.*, 1999) et la fraction de cellules en phase S (Leskinen-Kallio *et al.*, 1991) a été rapportée dans certains types de tumeurs. En clinique, ce traceur présente un avantage par rapport au FDG lorsque les tumeurs sont dans des tissus à forte glycolyse (par exemple des gliomes dans le cerveau; Yamamoto *et al.*, 2008) ou lorsque les tumeurs sont hypométaboliques (Chung *et al.*, 2002), mais offre en général une captation tumorale nette plus faible que le FDG (Inoue *et al.*, 1996).

1.8.5. 3'-désoxy-3'-([¹⁸F])-fluorothymidine (FLT)

La 3'-désoxy-3'-fluorothymidine (FLT) a été synthétisée pour la première fois en 1969 comme inhibiteur sélectif de la synthèse de l'ADN (Langen *et al.*, 1969). La version radiomarquée pour l'imagerie TEP n'a été développée que beaucoup plus tard (Grierson *et al.*, 1997) pour évaluer la prolifération *in vivo* des cellules constituant les tissus. Le FLT entre à l'intérieur des cellules à la fois par des transporteurs et par diffusion passive (Kong *et al.*, 1992). L'enzyme thymidine kinase 1 (TK1) du cytoplasme cellulaire phosphoryle le FLT pour faire du FLT-monophosphate; ceci constitue l'étape cruciale pour la captation de ce produit (Grierson *et al.*, 2004). Ainsi, une corrélation entre la captation *in vitro* de [¹⁸F]-FLT

et l'activité TK1 de cellules de carcinome pulmonaire humain a pu être observée (Rasey *et al.*, 2002). De plus, l'activité de la TK1 est fortement corrélée avec la prolifération cellulaire (Ellims *et al.*, 1981), et est exprimée plus fortement en phase S du cycle cellulaire (Sherley et Kelly, 1988). En clinique, chez des patients atteints de gliomes, une forte corrélation a été tirée entre la captation du [^{18}F]-FLT (SUV) et l'indice Ki67 (Hatakeyama *et al.*, 2008). Une autre étude dans des tumeurs pulmonaires a aussi montré de fortes corrélations entre la captation de [^{18}F]-FLT et l'indice Ki67, en plus d'une corrélation (plus faible) entre la captation de [^{18}F]-FLT et la fraction de cellules en phase S (Vesselle *et al.*, 2002).

Néanmoins, l'utilisation de ce traceur dans des modèles de rongeurs est limitée et nécessite des protocoles et/ou des conditions spécifiques. En effet, puisque les rongeurs ont de 9 à 16 fois plus de thymidine circulante que les humains (Nottebrock et Then, 1977), et que la TK1 a 4 fois plus d'affinité pour la thymidine que pour le FLT (Munch-Petersen, 1991), la captation spécifique dans les tissus est de faible à inexistante chez le petit animal. Pour contourner ce problème, l'injection intraveineuse de thymidine phosphorylase (qui convertit la thymidine en thymine) avant et pendant l'injection de [^{18}F]-FLT pour réduire la compétition entre la thymidine endogène et le FLT a été proposé et a conduit à des succès variables (van Waarde *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009). D'autres facteurs pourraient influencer la captation de FLT chez le petit animal, tels que la température de l'animal (Tseng *et al.*, 2005) et la race de souris/rat (suggéré dans Bading et Shields, 2008).

1.9 Présentation des projets

1.9.1. Mise en contexte

L'imagerie TEP au [^{18}F]-16 α -fluoroestradiol (FES) offre l'opportunité de détecter des tumeurs du sein ER+ et a un potentiel pronostique, surtout pour les métastases difficiles d'accès par biopsie, ou les récurrences. Bien que la corrélation entre le statut en ER et la captation de FES ait été établie à quelques reprises

dans des études précliniques (autant *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo*) et cliniques, cette modalité ne réussit pas à s'imposer comme méthode diagnostique/pronostique face aux méthodes plus classiques (surtout la biopsie), même dans des centres TEP disposant du FES. L'accumulation de données quant à la fiabilité de la TEP au FES et la mise au point des protocoles pourraient contribuer à améliorer l'impact réel de cet outil pour la prise de décision en clinique.

L'avènement d'appareils TEP précliniques de haute résolution et à haute sensibilité donne l'opportunité de suivre l'expression tumorale *in vivo* des ER, par l'utilisation du FES, dans des modèles animaux. Des travaux antérieurs (Aliaga *et al*, 2004) utilisant des greffes de tumeurs MC7-L1 et MC4-L2 (Lanari *et al*, 2001) ont mené à un modèle préliminaire d'imagerie murin au FES de tumeurs ER+. Par la même occasion, le suivi sur 7 semaines de la taille de ces tumeurs sous différentes thérapies ont permis de constituer la base d'un modèle de tumeurs répondant aux thérapies hormonales *in vivo*.

Afin de tester le potentiel de discernement du statut en ER de l'imagerie au FES, l'utilisation d'un modèle comparatif où des tumeurs possèdent différents niveaux d'expression des ER est de mise. L'arrivée récente de banques de shRNA sur le marché a fourni l'occasion de pouvoir réprimer spécifiquement l'expression d'un gène donné sur une lignée, permettant des comparaisons isogéniques entre la lignée parentale et la lignée portant les shRNA. De plus, la répression de l'expression d'un gène par cette méthode, contrairement à la délétion d'un gène (ou à l'utilisation d'une lignée différente n'exprimant pas le gène d'intérêt), donne une réduction nuancée et spécifique d'un gène. Ainsi, la répression d'ER α sur des lignées ER+ permettrait d'avoir un modèle comparatif plus rigoureux pour évaluer le pouvoir de discernement de l'imagerie TEP au FES que l'utilisation d'une paire de tumeurs ER+/ER-.

De plus, un tel modèle représenterait une occasion unique d'évaluer l'effet d'une répression spécifique d'ER α sur la réponse tumorale à différents agents

d'hormonothérapie. S'il est bien connu que la perte d'expression des ER est associée à une baisse drastique d'efficacité des agents de thérapie hormonale, un tel changement de statut est aussi associé à des changements phénotypiques et génotypiques. L'utilisation de l'imagerie TEP au [^{18}F]-fluorodésoxyglucose (FDG) et à la [^{11}C]-méthionine ([^{11}C]-MET) permet d'envisager le suivi *in vivo* longitudinal de l'effet sur le métabolisme tumorale de ces thérapies. En parallèle, l'utilisation de la [^{18}F]-fluorothymidine (FLT) comme traceur TEP de prolifération s'avèrerait un outil intéressant pour le suivi de ces thérapies. Par contre, compte tenu de la faible captation spécifique de ce traceur chez les rongeurs, des optimisations du protocole sont requises.

Enfin, au cours des dernières années, le 4-fluoro-11 β -méthoxy-16 α -[^{18}F]-fluoroestradiol (4FMFES), un nouveau traceur des ER similaire au FES, a été développé. Des tests *ex vivo* sur des souris et des rats femelles, ainsi que des essais d'imagerie TEP clinique sur des sujets sains, ont été effectués. Ces résultats préliminaires montrent une captation utérine supérieure au FES, ainsi qu'une moindre présence d'activité dans le sang, ce qui indique un fort potentiel pour améliorer l'imagerie TEP des ER. Par contre, aucune image TEP au 4FMFES de tumeurs (clinique ou animale) n'avait été publiée avant nos travaux. L'évaluation du 4FMFES comme agent d'imagerie pourrait bénéficier d'un modèle tumoral optimisé pour la TEP au FES.

1.9.2. Objectifs

Tout d'abord, dans le but d'obtenir un modèle tumoral comparatif pour ER α , des lignées stables exprimant un shRNA ciblant les ARNm d'ER α (ER α -knockdown, ou ER α KD), et donc ayant une répression de l'expression d'ER α à partir des lignées murines MC7-L1 et MC4-L2 (ER+) seront créées. Ensuite, la validation que ces shRNA ont l'effet voulue et la caractérisation de ces nouvelles lignées sera accomplie par différents tests biochimiques (qPCR, immunobuvardage), pharmacologiques (courbe dose-déplacement, essai de saturation) et phénotypique (vitesse de croissance, morphologie). Lorsque ces

tests seront concluants, ces lignées pourront être implantées chez la souris Balb/c dans le but d'effectuer les différents projets d'imagerie. En premier lieu, un protocole d'imagerie TEP quantitative au FES sera développé pour montrer la capacité de ce traceur de différencier des tumeurs ER+ de leurs équivalents ER α KD (article 1). Deuxièmement, un suivi longitudinal par imagerie TEP au FDG et au [¹¹C]-MET sera effectué sur des souris porteuses de tumeurs ER+ et ER α KD et recevant l'une des trois hormonothérapies suivantes : le fulvestrant (un puissant antagoniste), le letrozole (un inhibiteur d'aromatase) et le tamoxifène (un modulateur sélectif des ER); ces résultats sont présentés dans l'article 2. En parallèle, un protocole visant à réduire chez la souris le taux de thymidine circulante par injection intraveineuse de différentes quantités de thymidine phosphorylase dans le but de permettre l'utilisation du FLT pour les suivis thérapeutiques sera testé (section 5.2.4.). Finalement, le modèle de souris porteuse de tumeurs ER+ et ER α KD sera utilisé pour évaluer le potentiel en imagerie TEP du traceur 4FMFES, et pour comparer ses performances avec celles du FES (article 3).

2. Article 1 :

Imagerie TEP quantitative au [¹⁸F]-Fluoroestradiol (FES) pour différencier des tumeurs mammaires ER+ de tumeurs réprimées en ER α chez la souris

Auteurs de l'article: Michel Paquette, René Ouellet, Mélanie Archambault, Étienne Croteau, Roger Lecomte et François Bénard

Statut de l'article: Publié; Nuclear Medicine and Biology **39**:57-64, 2012 (DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2011.06.004).

Avant-propos: Bien que ce manuscrit ait été revu et corrigé par l'ensemble des co-auteurs, le design expérimental, l'écriture du texte original, la conception des figures et le suivi des corrections tant des co-auteurs que des réviseurs a été fait entièrement par le premier auteur de cet article et auteur de la présente thèse (Michel Paquette). De plus, à l'exception de la synthèse des radiotraceurs FDG et FES (l'équipe du cyclotron, dont R. Ouellet), et des résultats de qPCR (centre de RNomique de l'Université de Sherbrooke), l'ensemble du travail expérimental a été effectué par ce même Michel Paquette, avec assistance technique et théorique mineure de la part de M. Archambault et E. Croteau (pose de canules caudales occasionnelles aux souris, soins aux animaux, suggestions de protocoles, etc). Dr Lecomte et Dr Bénard ont quant à eux supervisé les travaux, ce dernier étant l'auteur de correspondance de cet article.

Résumé

Dans le but d'investiguer l'utilisation du 16α - ^{18}F -fluoro- 17β -estradiol (FES) comme agent d'imagerie TEP capable de discriminer des tumeurs ayant différents statuts en récepteurs d'estrogène α ($\text{ER}\alpha$), un modèle de souris porteuses de tumeurs a été développé. À cet effet, de nouvelles lignées stables réprimées en $\text{ER}\alpha$ ($\text{ER}\alpha$ -knockdown; $\text{ER}\alpha\text{KD}$) ont été créées par infection lentivirale d'un shRNA à partir des lignées d'adénocarcinomes mammaires murins ER^+ MC7-L1 et MC4-L2. Un immunobuvardage contre $\text{ER}\alpha$ a indiqué une baisse de l'expression de la protéine d'environ 75%, tandis que des essais de compétition et de saturation au ^3H -estradiol ont indiqué une baisse de liaison maximale (B_{Max}) de 50%. Ces lignées (ER^+ et $\text{ER}\alpha\text{KD}$) ont été implantées en sous-cutané à des souris Balb/c femelles pour former des tumeurs d'au moins 20 mm^3 avant l'imagerie par TEP soit au FES ou au ^{18}F -2-fluoro-2-désoxy-D-glucose (FDG). La captation de FES par imagerie TEP a été de $1.06 \pm 0.21 \text{ \%ID/g}$ pour les tumeurs MC7-L1 et de $0.47 \pm 0.08 \text{ \%ID/g}$ pour les tumeurs MC7-L1 $\text{ER}\alpha\text{KD}$. Quant aux tumeurs MC4-L2, la captation de FES est de $1.03 \pm 0.30 \text{ \%ID/g}$, tandis que leur équivalent $\text{ER}\alpha\text{KD}$ obtient une captation de $0.51 \pm 0.19 \text{ \%ID/g}$. Chaque tumeur $\text{ER}\alpha\text{KD}$ a une valeur de \%ID/g significativement plus basse de $\sim 50\%$ que leur contrepartie ER^+ . La biodistribution au FES a confirmé ces résultats et donné des \%ID/g ne montrant pas de différence significative comparée aux \%ID/g obtenus par TEP. Il n'y a pas de différence significative entre les différentes tumeurs en TEP au FDG, indiquant que le métabolisme des tumeurs $\text{ER}\alpha\text{KD}$ n'est pas altéré. En conclusion, la TEP au FES est capable de différencier des tumeurs ayant différents niveaux d'expression d' $\text{ER}\alpha$ dans un modèle murin. De plus, les données quantitatives en TEP et en biodistribution concordent avec les résultats *in vitro*.

[¹⁸F]-Fluoroestradiol (FES) Quantitative PET Imaging to Differentiate ER+ and ER α -Knockdown Breast Tumors in Mice

Michel Paquette¹, René Ouellet¹, Mélanie Archambault¹, Étienne Croteau¹, Roger Lecomte¹ and François Bénard^{*2}

1. Sherbrooke Molecular Imaging Center, Department of Nuclear Medicine & Radiobiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

2. BC Cancer Agency Research Center and Department of Radiology, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada

Abbreviated Title: Small animal PET imaging of ER α expression

* Corresponding author:

François Bénard, MD, FRCPC
BC Cancer Agency Research Centre
675 West 10th Avenue
Vancouver, BC
V5Z 1L3
Phone: 604-675-8206
FAX: 604-675-8218
E-mail: fbenard@bccrc.ca

ABSTRACT

Introduction: The purpose of this study was to develop a non-invasive model in tumor-bearing mice to investigate the use of 16α - ^{18}F -fluoro- 17β -estradiol (FES) PET imaging as a tool to discriminate between tumors having different ER α status.

Methods: MC7-L1 and MC4-L2 murine mammary adenocarcinoma cell lines (ER+) received a small hairpin RNA (shRNA) targeting the ER α gene by lentiviral infection. *In vitro* assessment of ER α levels of the new cell lines (MC7-L1 and MC4-L2 ER α -knockdown; ER α KD), compared to the parental cell lines, was performed by immunoblotting (-75% ER α protein) and binding assays (-50% estrogen binding). These cell lines were implanted subcutaneously in Balb/c mice and allowed to grow up to a volume of at least 20 mm³. FES and [^{18}F]-fluorodésoxyglucose (FDG) PET images were acquired to measure FES and FDG uptake in the various tumors.

Results: FES uptake as assessed by PET imaging was 1.06 ± 0.21 %ID/g for MC7-L1 tumors and 0.47 ± 0.08 %ID/g for MC7-L1 ER α KD tumors. MC4-L2 tumors had a FES uptake of 1.03 ± 0.30 %ID/g, whereas its ER α KD equivalent was 0.51 ± 0.19 %ID/g. Each ER α KD tumor had a significantly lower %ID/g value, by ~50%, than its ER+ counterpart. Biodistribution studies confirmed these findings and gave %ID/g values that were not significantly different from PET imaging data. FDG PET showed no significant uptake difference between the ER+ and ER α KD tumors, indicating that the metabolic phenotype of the ER α KD cell lines was not altered.

Conclusion: FES PET imaging was able to reliably differentiate between tumors having differences in their ER α expression *in vivo*, in a mouse model. Quantitative data obtained by FES PET were in concordance with biodistribution studies and *in vitro* assays. It is concluded that FES PET imaging can likely be used to monitor subtle ER status changes during the course of hormone therapy.

Keywords: Small animal PET; Estrogen receptor; FES; Breast cancer; shRNA

INTRODUCTION

The status of the estrogen receptors (ER) is of prime importance in breast cancer in order to choose the appropriate therapeutic approach and to determine the prognosis of the illness [1-3]. While biopsy is still the golden standard to evaluate the estrogen receptor status of a breast lesion, different estrogenic radiotracers have been developed to assess this parameter by PET imaging [4-6]. Of these, 16α -[^{18}F]-fluoro- 17β -estradiol (FES) is commonly used in animal research [7,8] and clinical trials [9-11] to detect ER+ lesions.

MC7-L1 and MC4-L2 mouse mammary carcinoma cell lines have been previously described [12] and successfully imaged by FES positron emission tomography (PET) imaging [8]. These cell lines have a positive status for estrogen receptor α , the ability to grow fast *in vitro* and in immune competent mice, and are responsive to hormone therapy *in vivo* [8], making them a suitable model for breast cancer.

To test the ability of FES PET imaging to differentiate lesions having different estrogen receptor status, new stable cell lines have been created. MC7-L1 and MC4-L2 cells received, *via* lentiviral infection, small hairpin RNA (shRNA) sequences targeting and silencing the ER α gene by RNA interference (RNAi) [13,14]. In order to confirm the efficiency of the ER α gene silencing, we characterized these new cell lines by immunoblotting and receptor binding assays. Estrogen receptor expression in tumors derived from the new cell lines (ER α -Knockdown; ER α KD) in comparison with the parental lines (ER+) was quantified *in vivo* by small animal PET imaging and biodistribution. Together, these experiments demonstrate the ability of FES PET imaging to detect tumors having differences in their estrogen receptor gene expression in an animal model of estrogen-dependent breast cancer.

MATERIALS AND METHODS

Cell Line Modification

The human cell line 293T received *via* lipofectamine transfection 7.5 μg of the plp1, plp2 and plp/VSV-G plasmids (Invitrogen, Burlington, ON) and 7.5 μg pLKO.1-puro plasmid containing a shRNA sequence targeting the murine ER α (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After 48 hours incubation, the lentivirus-rich supernatant (cell media) was taken and filtered with a 0.45 μm filter, then kept at -80°C for further use.

MC7-L1 and MC4-L2 cell lines (murine mammary ductal carcinoma; ER+) were generously provided by Pr. A. Molinolo from the Instituto de Biología y Medicina Experimental in Buenos Aires, Argentina and described in [12]. These cells were infected by an aliquot of the virus-enriched supernatant containing 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polybrene. The next day, cells were then incubated for at least 1 week in DMEM containing 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puromycin as selection agent. Puromycin-resistant cells were expanded and further tested to see if expression of the ER α gene was knocked-down (ER α KD). All manipulations were done following containment level 2 procedures.

Cell Line Characterization

Confirmation of ER α status of the MC7-L1, MC7-L1 ER α KD, MC4-L2 and MC4-L2 ER α KD cell lines was made using binding assays and Western blots. Competitive binding assays were performed in triplicate using 1 nM [^3H]-estradiol against varying concentrations (0.1 pM to 1 μM) of unlabeled estradiol.

Saturation curves were plotted using 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 nM [^3H]-estradiol, with or without 1 μM estradiol, also in triplicate. The receptor density (B_{max}) and the dissociation constant (K_{d}) were calculated using the GraphPad Prism software. In parallel, protein extraction was carried out on cell samples using an alkaline lysis protocol and the protein concentration determined using Bradford assays. DNA extraction was achieved using TriPure (Roche Applied Science) reagent and DNA concentration was monitored by 260 nm spectrometry. Also, in other plate wells, cells were counted using a hemacytometer. The extrapolated amount of [^3H]-estradiol to reach the B_{max} using curve fit analysis was

taken to calculate the quantity of ER in each cell lines, either per mg of proteins, μg of DNA or per 10^5 cells.

Cell samples for Western blots were harvested by plate scraping, then by addition of a lysis buffer (1% SDS, 1% Tween-20, 400 mM NaCl, 10 mM β -mercaptoethanol) containing Complete™ Mini Protease Inhibitor tablets (Roche). Samples were boiled for 5 minutes, and cells debris were discarded by centrifugation. SDS-PAGE was done using an 8% acrylamide separating gel; samples containing 10 μg of proteins per lane were migrated at 100 V for 2 hours. Blotting was done by electrophoresis on a Hybond-P membrane (GE Healthcare Life Sciences). Anti-actin rabbit IgG antibody (Sigma-Aldrich) was used as loading control for each blot. Anti-ER α and anti-ER β rabbit monoclonal antibodies (Millipore, CA, USA) were used to assess the presence of either ER α or ER β in each cell lines. Anti-rabbit goat horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody was used as secondary antibody. ECL Plus Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences) was used to reveal the signals; the reagent is transformed by the HRP into an fluorescent acridinium ester intermediate. Membranes were then scanned using a Storm 860 Molecular Imager (GMI Inc) in blue fluorescence mode, and signals were quantified using the ImageQuant™ software (GE Healthcare Life Sciences).

qPCR

Expression levels of ER α and ER β mRNA were obtained by real-time PCR. Total RNA extractions were performed on cell pellets with the RNeasy mini kit (Qiagen) as recommended by the manufacturer, with DNase treatments. RNA integrity was assessed with an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Reverse transcription was performed on a maximum of 2 μg total RNA with Transcriptor reverse transcriptase, random hexamers, dNTPs (Roche Diagnostics), and 10 units of RNaseOUT (Invitrogen) following the manufacturer's protocol in a total volume of 20 μl . All forward and reverse primers were individually resuspended to 20-100 μM stock solution in Tris-EDTA buffer (IDT) and diluted as a primer pair to

1 μ M in RNase DNase-free water (IDT). Quantitative PCR (qPCR) reactions were performed in 10 μ l in 96 well plates on a Realplex2 thermocycler (Eppendorf) with 5 μ L of 2X FastStart Universal SYBR Green Master mix (Roche Diagnostics), 10 ng (3 μ l) cDNA, and 200 nM final (2 μ l) primer pair solutions. The following cycling conditions were used: 10 min at 95°C; 50 cycles: 15 sec at 95°C, 30 sec at 60°C, 30 sec at 72°C. Relative expression levels were calculated using the qBASE framework [15] and the housekeeping genes UBC, HPRT1 and GAPDH for mouse cDNA. Primer design and validation was evaluated as described elsewhere [16]. In every qPCR run, a no template control was performed for each primer pair and these were consistently negative.

Animals

The animal experiments were conducted according to the recommendations of the Canadian Council on Animal Care and the in-house Ethics Committee for Animal Experiments. MC7-L1, MC7-L1 ER α KD, MC4-L2 and MC4-L2 ER α KD were inoculated subcutaneously (1×10^7 cells) in the axillary area and in the middle of the back of Balb/c mice (Charles River, Montreal, Canada), each mouse carrying 4 tumors, one of each cell type. Implantation of the tumors was done under anaesthesia (13 mg/ml Ketamine, 86 mg/ml Xylazine; 1 ml/kg, i.p.). Tumors were allowed to grow up to 3-5 mm in diameter before use in further experiments; tumor size was assessed every 2 days by caliper measurements.

Radiochemistry

Fluorine-18 was prepared by the $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ reaction on ^{18}O -enriched water as target material using a TR-19 cyclotron (ACSI, Vancouver, Canada). The methods used in the synthesis of FDG and FES have been previously reported [17,18].

Quantitative PET Imaging

All PET imaging studies were performed using a small animal PET scanner (LabPETTM, Gamma Medica Inc.) having a 3.75 cm axial field-of-view and achieving 1.35 mm resolution [19]. Mice were placed on the scanner bed in the

prone position, under isoflurane anaesthesia (1% at 2 l/min oxygen flow). Imaging was initiated 1 hour after the i.v. injection (via the caudal vein) of 3.5-5.0 MBq [^{18}F]-FES. Acquisition was done for 30 minutes centered on the tumors, in double sampling mode. Immediately after, a second injection of 18-21 MBq [^{18}F]-FDG was made via the caudal vein, while keeping the animal in the same bed position. One hour later, a 15-minute static image was acquired in double sampling mode to help localize tumors accurately. Whole-body imaging was performed on two mice using similar doses of radiotracers as for the static scans. For the FES whole-body scans, a 15-minute decay-compensated static image acquisition sequence with three bed positions was launched to entirely cover the animal body, while 10-minute decay-compensated scans were used for the subsequent FDG scans.

The images were reconstructed using 20 iterations of an MLEM algorithm implementing a physical description of the detectors in the system matrix [20]. ROIs were drawn on the FDG images and copied to the FES images to ensure optimal tumor contour definition. Quantification of the tumor uptake was performed using the in-house LabTEP image analysis software. The FES signal was estimated by searching the highest 2×2 cluster of voxels within the tumor ROI. The background from circulating radiotracer and non-specific tissue uptake was estimated from a reference ROI placed on muscular tissues. This average background count rate was subtracted from the tumor peak count rate to obtain the net tumor uptake. After each scan sequence, a cylindrical phantom the approximate size of a mouse (24.75 ml) containing a known quantity of ^{18}F (≈ 5 MBq FDG) was used to obtain a calibration factor to convert the counts per seconds into absolute activity measurements in kBq, from which the injected dose per gram of tissue (%ID/g) values were derived. A density of 1 g/cc was used to convert the fractional uptake per volume into %ID/g.

Biodistribution

At 1 hour post injection of 1.5 MBq FES, tumor-bearing mice ($n = 6$) were euthanized under deep Isoflurane anaesthesia (2.5% at 2 l/min oxygen flow) by

CO₂ inhalation. Tissues of interest were removed, rinsed in saline, blotted dry and placed in pre-weighted tubes, all within 20 minutes. Radioactivity was counted in a Packard Cobra II Auto-Gamma Counter, corrected for decay and expressed as % ID/g.

Statistics

Standard deviation of the mean (SD) was used to determine the spread of data around the mean. The data obtained from the peak tumor uptake minus average reference tissue of ER⁺ tumors were compared to the set of data from the corresponding ER-KD tumors. A paired two-tailed Student t-test was used to check if the difference between any two groups was statistically significant, with a probability threshold of 0.05.

RESULTS

Immunoblotting

Protein extracts from the different cell lines were immunoblotted with either anti-ER α , anti-ER β and anti-actin antibodies to assess the down-regulation of estrogen receptor proteins caused by RNAi (Figure 1). While there were no changes of ER β or actin expression in all cell lines, there was a significant reduction of ER α protein expression in ER α KD cell lines (both MC7-L1 and MC4-L2) compared to their ER⁺ equivalent. ER α signals were quantified, and then normalized to the corresponding actin signal using ImageQuant™. According to this quantification, ER α expression decreased by about 75% in both MC7-L1 and MC4-L2 ER α KD cell lines.

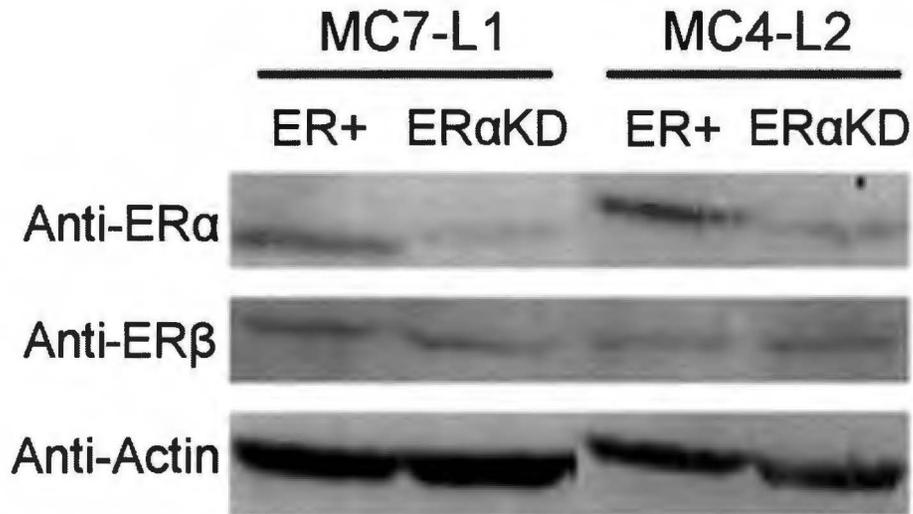


Figure 1: Immunoblotting using primary antibodies against ER α , ER β and actin (control) on MC7-L1 and MC4-L2 (ER+ and ER α KD) protein extracts (10 μ g per lane). ER α -knockdown (ER α KD) cell lines are compared to ER+ cell lines. ER-KD cells have \approx 75% less ER α receptor proteins than ER+ cells.

qPCR

Relative quantifications of the mRNA levels of ER α and ER β were achieved using qPCR. According to this method, a decrease in ER α of 59% was observed in MC7-L1 ER α KD cell lines compared to MC7-L1 ER+ cell lines. Similarly, ER α levels dropped by 50% in MC4L2 ER α KD compared to MC4-L2 ER+ cell lines. The number of PCR cycles necessary for the apparition of detectable products (Ct) was much higher for ER β (32-33) than for ER α (23-25), suggesting that the ER β mRNA levels are appreciably lower than the ER α mRNA levels.

Receptor binding assays

Differences in estrogen binding properties between ER+ and ER α KD cell lines were first evaluated using competitive binding assays (Figure 2). The difference between the average values of the upper plateau and the average values of the lower plateau (background) allowed the estimation of the relative changes in maximum binding between each cell lines. Based on this method, the maximum binding of ER α KD cell lines was found to be 30-35% lower than for the ER+ cells, for both the MC7-L1 and MC4-L2 cell lines.

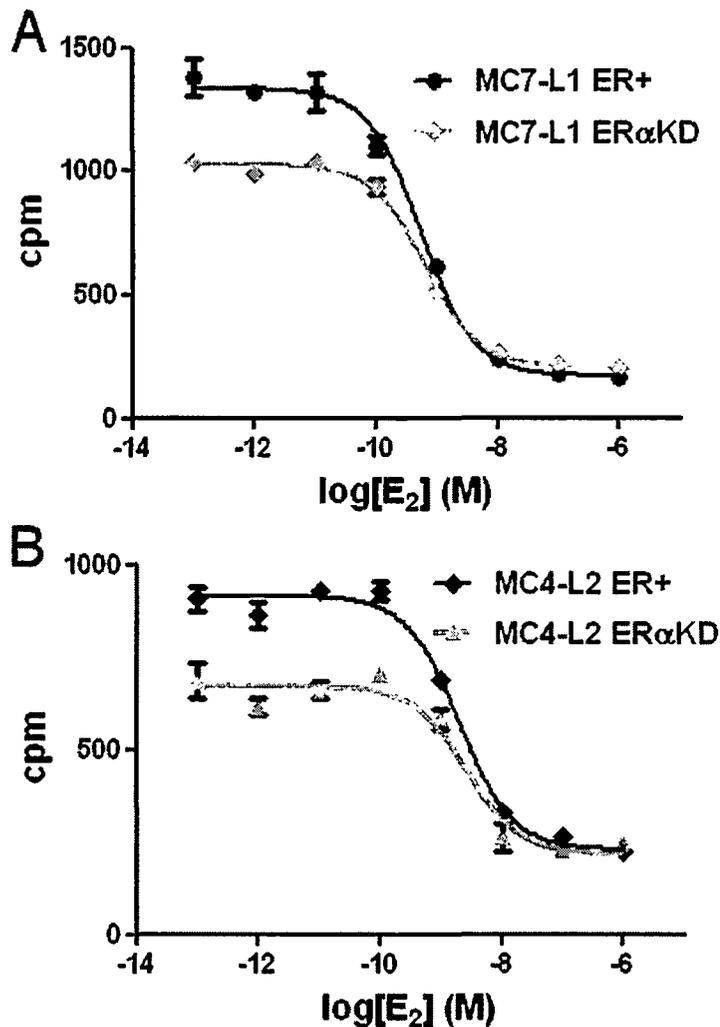


Figure 2: Average dose-displacement curves of ER⁺ and ER α -knockdown (ER α KD) MC7-L1 (A) and MC4-L2 (B) cell lines (n=3) using 10^{-9} M [³H]-estradiol against 10^{-6} M to 10^{-13} M estradiol (E₂).

To further characterize the estrogen binding of all cell lines, saturation curves were obtained using from 0.12 to 5 nM [³H]-estradiol, with or without 10^{-6} M estrogen, taking into account the nonspecific binding (Figure 3). In parallel, DNA and protein concentration, as well as cell number were measured for each set of data. From these results, fmol ER/mg of protein, fmol ER/ μ g of DNA and fmol ER/ 10^5 cells were calculated. Table 1 summarizes these results for each cell line, as well as their affinity constant (K_d). In all cases, ER α KD cell lines had a lower estrogen receptor concentration than ER⁺ cells, which was consistent with expectations. Overall, a 50% decrease of estrogen B_{max} was observed for the new ER α KD cell

lines. No significant differences in K_d are observed between ER+ and ER α KD cell lines, as expected.

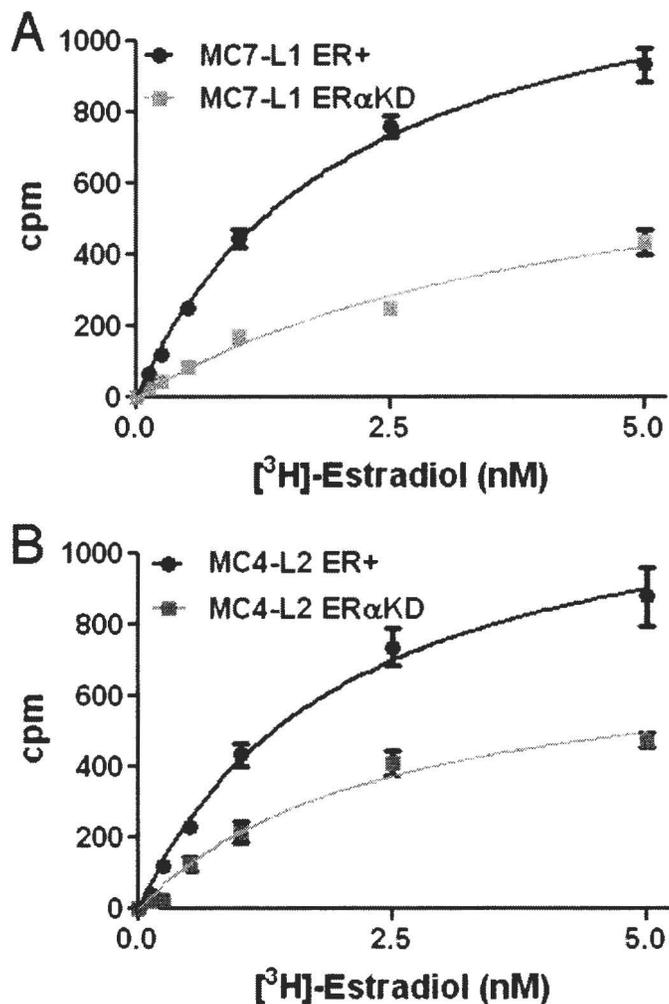


Figure 3: Saturation curves of MC7-L1 (A) and MC4-L2 (B) cell lines (ER+ and ER α -knockdown (ER α KD) using 0 to 5 nM [³H]-estradiol. The shown curves are the result of the total binding ([³H]-estradiol only) less non-specific binding (addition of 1 μ M unlabeled estradiol).

	MC7-L1	MC7-L1 ER α KD	MC4-L2	MC4-L2 ER α KD
fmol ER/ mg protein	71 \pm 25	33 \pm 16	54 \pm 6	34 \pm 3
fmol ER/ μ g DNA	0.85 \pm 0.14	0.42 \pm 0.19	0.60 \pm 0.30	0.36 \pm 0.04
fmol ER/ 10 ⁵ cells	12.8 \pm 2.1	7.1 \pm 2.1	11.1 \pm 1.1	6.9 \pm 1.3
K _d (nM)	1.8 \pm 0.2	2.2 \pm 0.7	2.0 \pm 0.4	2.4 \pm 0.5

Table 1 :Quantification and Kd of ERs in each cell line

***In vivo* Tumor Growth**

Following subcutaneous implantation of the different cell lines in Balb/c mice, tumor growth was monitored using a caliper measurement at 2 days intervals. All cell lines grew at about the same rate *in vivo*, and the mean tumor volumes after 21 days for each cell lines were: MC7-L1, 22.1 \pm 4.8 mm³; MC7-L1 ER α KD, 24.0 \pm 6.6 mm³; MC4-L2, 23.9 \pm 6.8 mm³; MC4-L2 ER α KD, 26.6 \pm 7.1 mm³ (n = 16). No significant differences in average tumor size after 21 days were observed between the different cell lines.

FES Tumor Uptake by PET

The 30-minute FES and 15-minute FDG static images of the four tumor-bearing mice were analyzed. Although ER+ tumors were clearly defined in the FES PET images, their ER α KD counterparts were barely visible (Figures 4 and 5A). On the other hand, all tumors were clearly visible in FDG PET images (Figures 4 and 5B). Since the FDG scans were acquired immediately after the FES scan, with the mice in the same position on the scanner bed, images obtained with FES and FDG were superimposed and compared slice by slice to draw tumor ROIs.

Tumor ROIs were quantified and %ID/g values were calculated for each tumor (Figure 6). Hence, FES uptake values obtained by PET imaging (n=5) were 1.06 \pm 0.21 %ID/g for MC7-L1 tumors and 0.47 \pm 0.08 %ID/g for MC7-L1 ER α KD tumors. For the MC4-L2 tumors, the ER+ lesions had a FES uptake of 1.03 \pm 0.30 %ID/g, whereas the ER α KD tumor uptake reached 0.51 \pm 0.19 %ID/g. For FDG PET imaging, the tumor uptake values were in the 2.5-3.1 %ID/g range and no

significant uptake differences ($p > 0.24$) were observed between ER+ and ER α KD tumors ($n = 5$).

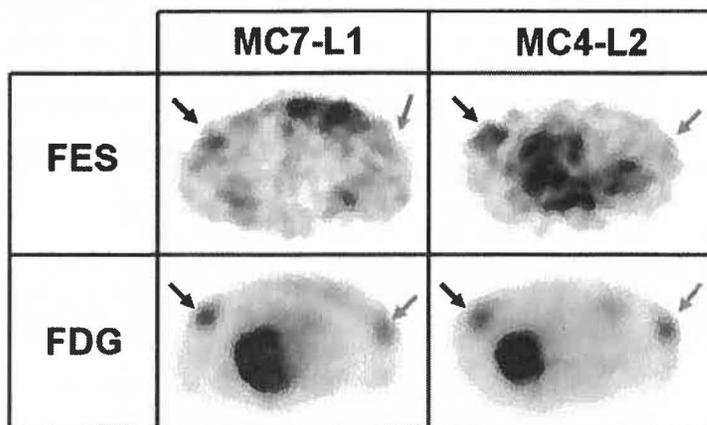


Figure 4: Representative transaxial slices of FES and FDG PET images in the same mouse through the MC7-L1 (left) and MC4-L2 tumors (right). Black arrows, ER+ tumors; grey arrows, ER α KD tumors.

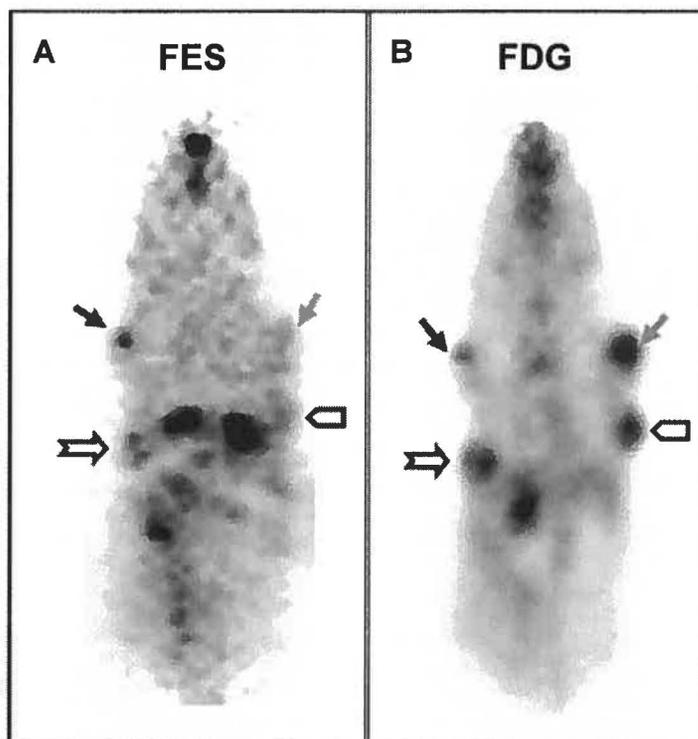


Figure 5: Representative coronal slices through the whole-body FES and FDG PET images in the same mouse. Black arrows, MC7-L1 ER+ tumor; grey arrows, MC7-L1 ER α KD tumor; empty arrow, MC4-L2 ER+ tumor; arrowhead, MC4-L2 ER α KD tumor.

Biodistribution Following FES Injection

To support the data obtained *via* FES PET imaging, the radiotracer biodistribution was measured in different organs and the tumors 1 hour after injection of 1.5 MBq FES. The %ID/g was calculated for each tissue sample (Figure 6). While the MC7-L1 and MC4-L2 ER+ tumors had FES uptakes of 1.08 ± 0.31 %ID/g and 1.15 ± 0.32 %ID/g, respectively, their ER α KD counterparts respectively had values of 0.54 ± 0.13 %ID/g and 0.64 ± 0.19 %ID/g. No significant differences were seen between data obtained by biodistribution and PET imaging for all tumors ($p > 0.30$). In comparison, uterus and ovary FES uptakes were 5.74 %ID/g and 5.76 %ID/g, respectively.

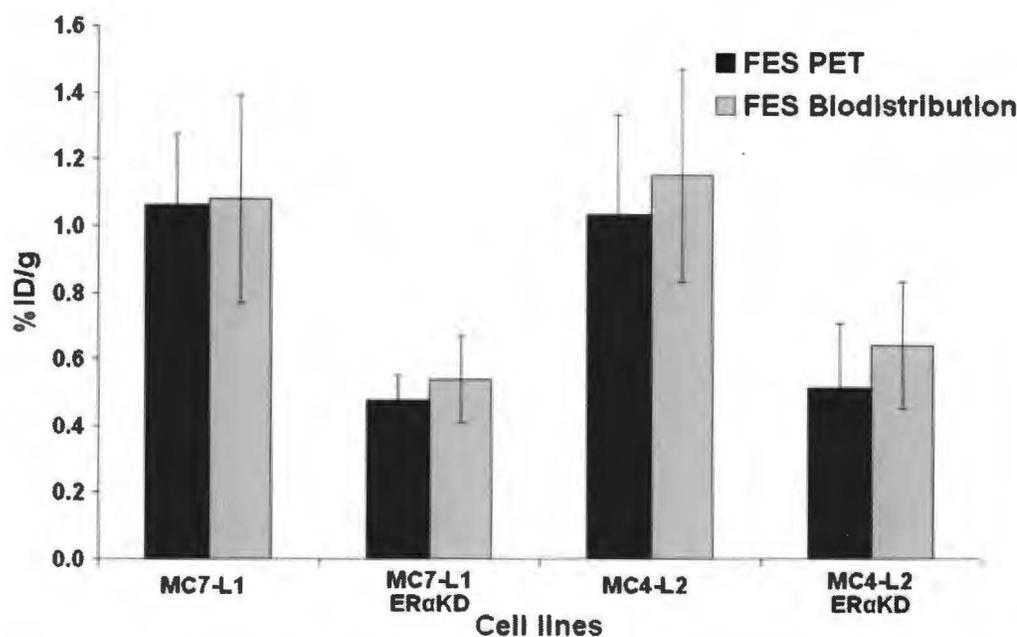


Figure 6: Tumor FES uptake in % injected dose per gram of tissue (%ID/g), using either biodistribution data (obtained 1 hour after injection of 1.5 MBq FES; $n = 6$) or PET data (1 hour after injection of 3.5 - 5.0 MBq FES; $n = 5$). ER α KD tumors have a significantly lower FES uptake than ER+ tumors ($p < 0.005$ for MC7-L1, $p < 0.01$ for MC4-L2). There are no significant differences between the biodistribution and PET data ($p > 0.29$).

DISCUSSION

[18 F]-Fluoroestradiol (FES) has already been used successfully to detect ER+ lesions [8,10]. However, considering the importance of ER status for the prognosis

of several endocrine diseases, research to improve estrogen receptor imaging is still ongoing [21-23]. One such study found a strong correlation between partial volume-corrected SUV of breast cancer lesions, as assessed by FES PET imaging, and the ER immunohistochemistry (IHC) index data obtained from biopsy of corresponding tumors in a clinical setting [24]. Another clinical study recently succeeded to differentiate grade 1 from grade 2 and 3 endometrial carcinomas with FES PET imaging using either FES SUV or FDG/FES SUV ratio [25].

The breast adenocarcinoma MC7-L1 and MC4-L2 cell lines have properties that make them a good choice for tumor-bearing mouse models. First and foremost, they both have stable expression of estrogen receptors (ER⁺), which is obviously a must to test an estrogenic tracer. Secondly, there is no need to use immunodeficient mice since these cell lines are of murine origin. Finally, their reasonably rapid *in vitro* and *in vivo* growth rate, without the need for estrogen priming, facilitates the experimental procedures. Starting from these two cell lines, a lentiviral-mediated infection of a shRNA sequence targeting the ER α transcripts allowed the creation of new stable cell lines, which have a lower expression of ER α gene (namely ER α -knockdown). This approach was favoured compared to the use of different ER⁻ cell lines in the present study for two reasons: 1) a subtle modulation of gene expression was a more stringent way of testing the differentiation potential of FES PET imaging than an ER⁺ *versus* ER⁻ comparison; and 2) in that way, ER⁺ and ER α KD cell lines will have the same genetic background, and a similar phenotype. The *in vitro* and *in vivo* growth rates of the ER α KD cell lines, as well as FDG uptake, were found to be very similar to those of ER⁺ cell lines, even though hormone receptors are known to influence cell division rate (amongst other effects). It is possible that the residual ER α activity, together with contribution of ER β activity, were enough to maintain the estrogen signalling pathways at a level sufficient to allow normal growth. Although we succeeded to create new ER α KD cell lines by RNAi, we also detected a relatively small but significant amount of ER β in all cell lines by immunoblotting and qPCR, which could influence tracer uptake. However, it should be noted that FES has selectivity

on ER α over ER β (6.3-fold affinity difference) [26], so the ER β contribution to the FES uptake is expected to be from minor to negligible. A 75% drop of ER α protein expression in ER α KD cells was detected by immunoblotting, and a 50-60% drop of mRNA transcription in ER α KD cells by qPCR, both being similar to the \approx 50% reduction of estrogen B_{\max} obtained by receptor saturation assays. Moreover, the FES signal measured by PET imaging and %ID/g obtained by FES biodistribution showed a similar drop of the FES uptake in ER α KD tumors compared to ER+ tumors (i.e. \approx 50%), further supporting the *in vitro* data.

In this work, the animals were not monitored for their oestrous cycle or their circulating estradiol levels. Since estradiol is the major agonist of the estrogen receptors, an unknown and random quantity of blood estradiol in the studied mice could have influenced the tumoral FES uptake from one subject to another. However, all mice were caged in groups of 4-5 (all females), which could induce anoestrus [27]. Moreover, a recent article shows that there are no correlations between FES SUV and circulating estrogen levels in breast cancer patients [28], supporting the idea that follow-up of the oestrous cycle of the mice in the present project is not necessary.

The imaging protocol used in these experiments consisted in a sequence of two successive image acquisitions with two different radiotracers (FES, then FDG). Although FDG images (and tumor signals) could be altered by residual FES uptake, many factors actually mitigate the impact of this effect. First, the primary radiotracer to be evaluated in this model was FES, which was injected first in the animal. The FDG scan served primarily to help localize the tumors for ROI contouring, and secondarily to confirm that there was no significant FDG uptake difference between ER+ and ER α KD tumors in our model. For that reason, FDG was injected at a dose about 5 times larger than FES, and the FDG image acquisition was done about one half-life after FES administration. Considering the large difference, by more than an order of magnitude, in uptake values between the receptor-based FES binding and the transporter-mediated FDG accumulation,

the benefit of having perfectly matching images of both tracers clearly overcomes the inconvenience of having residual FES uptake in FDG images in our experimental setting.

PET imaging was performed using a state-of-the-art high resolution small animal PET scanner (LabPET™ [19]) enabling imaging of 4 different tumor types simultaneously in the same mouse. Our experimental setting thus offered many advantages, as opposed to protocols involving only 1 or 2 tumors per animal. First, it allowed paired analysis since each ER+/ER α KD tumor pair was on the same animal, hence reducing bias and strengthening the statistical analysis. Second, the results were reliable because each group of four tumors was implanted at the same time, in the same mouse, hence in the same uniform conditions. Third, from an ethical perspective, it reduced the number of animals used for the whole project. In parallel, the project timeline, the radiotracer supply and the total utilization time of the scanner were all consequently reduced.

In the clinical setting, FES PET scans provide critical complementary information on the hormonal status of breast lesions, hence the relatively high importance of improving estrogen receptor imaging. This animal breast tumor model, along with quantitative FES imaging, could be quite adequate to improve existing scan protocols and to follow up estrogen receptor expression *in vivo* under certain conditions. Also, this mouse model would be ideal to test new estrogenic tracers in their potential to discern tumors that are clearly ER+, and more interestingly, tumors having a borderline positive status (like the ER α KD tumors). Finally, it would be of interest to assess if ER+ tumors have a different *in vivo* behavior than ER α KD under hormone therapy treatments.

CONCLUSION

$^{16}\alpha$ -[^{18}F]fluoro- $^{17}\beta$ -estradiol (FES) small animal PET imaging was shown to have the ability to differentiate estrogen receptor expression levels *in vivo* in mouse models of breast tumors with various levels of ER α expression. The PET data

were consistent with the results obtained by biodistribution (on tumor-bearing mouse) and by receptor binding assays (on the cell lines), demonstrating that FES PET imaging can reliably follow the *in vivo* estrogen receptor expression in tumors of interest. This ER+/ER α KD tumor model in combination with PET imaging provides a useful experimental model for an array of applications, from new estrogen-derived PET tracer testing to *in vivo* follow-up of estrogen receptor tumoral expression under different conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jean-François Beaudoin and Jules Cadorette for operating and maintaining the LabPET™ scanner. We also thank Mélanie Bergeron for her help on technical issues. Finally, we thank the Université de Sherbrooke RNomics Centre for the qPCR experiments and analysis. This project was supported by the Canadian Breast Cancer Research Alliance grant #015388, and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grant #MOP-86717.

REFERENCES

- [1] Clark GM, Sledge Jr GW, Osborne CK, McGuire WL. Survival from first recurrence: relative importance of prognostic factors in 1,015 breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1987;5:55-61.
- [2] Rose C, Thorpe SM, Andersen KW, Pedersen BV, Mouridsen HT, Blichert-Toft M, *et al.* Beneficial effect of adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients with high oestrogen receptor values. *Lancet* 1985;325:16-19.
- [3] Berthelsen CA, Giuliano AE, Kern DH, Mann BD, Roe DJ, Morton DL. Breast cancers: estrogen and progesterone receptor status as a predictor of *in vitro* chemotherapeutic response. *J Surg Res* 1984;37:257-263.
- [4] Van de Wiele C, De Vos F, Slegers G, Van Belle S, Dierckx RA. Radiolabeled estradiol derivatives to predict responses to hormonal treatment in breast cancer: a review. *Eur J Nucl Med* 2000;27:1421-1433.
- [5] VanBrocklin HF, Carlson KE, Katzenellenbogen JA, Welch MJ. 16 β -([¹⁸F]Fluoro)estrogens: Systematic investigation of a new series of fluorine-18-labeled estrogens as potential imaging agents for estrogen-receptor-positive breast tumors. *J Med Chem* 1993;36:1619-1629.
- [6] Ahmed N, Garcia G, Ali H, van Lier JE. ¹⁸F-labelling of A-ring substituted 16 α -fluoro-estradiols as potential radiopharmaceuticals for PET imaging. *Steroids* 2009;74: 42-50.
- [7] Katzenellenbogen JA, Mathias CJ, VanBrocklin HF, Brodack JW, Welch MJ. Titration of the *in vivo* uptake of 16 α -[¹⁸F]Fluoroestradiol by target tissues in the

- rat: competition by tamoxifen, and implications for quantitating estrogen receptors *in vivo* and the use of animal models in receptor-binding radiopharmaceutical development. *Nucl Med Biol* 1993;20(6):735-45.
- [8] Aliaga A, Rousseau JA, Ouellet R, Cadorette J, van Lier JE, Lecomte R, Bénard F. Breast cancer models to study the expression of estrogen receptors with small animal PET imaging. *Nucl Med Biol* 2004;31:761-770.
- [9] Dehdashti F, Mortimer JE, Siegel BA, Griffeth LK, Bonasera TJ, Fusselman MJ, *et al.* Positron tomographic assessment of estrogen receptors in breast cancer: comparison with FDG-PET and *in vitro* receptor assays. *J Nucl Med* 1995;36:1766-1774.
- [10] Mortimer JE, Dehdashti F, Siegel BA, Katzenellenbogen JA, Fracasso P, Welch MJ. Positron emission tomography with 2-[¹⁸F]Fluoro-2-deoxy-D-glucose and 16 α [¹⁸F]Fluoro-17 β -estradiol in breast cancer: correlation with estrogen receptor status and response to systemic therapy. *Clin Can Res* 1996;2:933-939.
- [11] Mintun MA, Welch MJ, Siegel BA, Mathias CJ, Brodack JW, McGuire AH, *et al.* Breast cancer: PET imaging of estrogen receptors. *Radiology* 1988;169:45-48.
- [12] Lanari C, Lüthy I, Lamb CA, Fabris V, Pagano E, Helguero LA, *et al.* Five novel hormone-responsive cell lines derived from murine mammary ductal carcinomas: *in vivo* and *in vitro* effects of estrogens and progestins. *Can Res* 2001;61:293-302.
- [13] Filipowicz W. RNAi: The nuts and bolts of the RISC machine. *Cell* 2005;122:17-20.
- [14] Dykxhoorn DM, Lieberman J. The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. *Annu Rev Med* 2005;56:401-423.
- [15] Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 2007;8: R19.
- [16] Brosseau JP, Lucier JF, Lapointe E, Durand M, Gendron D, Gervais-Bird J, *et al.* High-throughput quantification of splicing isoforms. *RNA*. 2010;16(2):442-9.
- [17] Hamacher K, Coenen HH, Stocklin G. Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[¹⁸F]-Fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution. *J Nucl Med* 1986;27:235-238.
- [18] Lim JL, Zheng L, Berridge MS, Tewson TJ. The use of 3-methoxymethyl-16-beta, 17-beta-epiestriol-O-cyclic sulfone as the precursor in the synthesis of [¹⁸F]-16 α -fluoroestradiol. *Nucl Med Biol* 1996;23:911-915.
- [19] Bergeron M, Cadorette J, Beaudoin JF, Lepage MD, Robert G, Selivanov V, *et al.* Performance evaluation of the LabPET™ APD-based digital PET scanner. *IEEE Trans Nucl Sci* 2009;56:10-16.
- [20] Selivanov V, Picard Y, Cadorette J, Rodrigue S, Lecomte R. Detector response models for statistical iterative image reconstruction in high resolution PET. *IEEE Trans Nucl Sci* 2000;47:1168-1175.
- [21] Lohith TG, Furukawa T, Mori T, Kobayashi M, Fujibayashi Y. Basic evaluation of FES-hERL PET tracer-reporter gene system for *in vivo* monitoring of adenoviral-mediated gene therapy. *Mol Imaging Biol* 2008;10:245-252.

- [22] Tsujikawa T, Yoshida Y, Kudo T, Kiyono Y, Kurokawa T, Kobayashi M, *et al.* Functional images reflect aggressiveness of endometrial carcinoma: estrogen receptor expression combined with ^{18}F -FDG PET. *J Nucl Med* 2009;50(10):1598-1604.
- [23] Dehdashti F, Mortimer JE, Trinkaus K, Naughton MJ, Ellis M, Katzenellenbogen JA, *et al.* PET-based estradiol challenge as a predictive biomarker of response to endocrine therapy in women with estrogen-receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009;113(3):509-517.
- [24] Peterson LM, Mankoff DA, Lawton T, Yagle K, Schubert EK, Stekhova S, *et al.* Quantitative imaging of estrogen receptor expression in breast cancer with PET and ^{18}F -fluoroestradiol. *J Nucl Med* 2008;49:367-374.
- [25] Tsujikawa T, Yoshida Y, Kiyono Y, Kurokawa T, Kudo T, Fujibayashi Y, *et al.* Functional oestrogen receptor α imaging in endometrial carcinoma using 16α - ^{18}F fluoro- 17β -oestradiol PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011;38:37-45.
- [26] Yoo J, Dence CS, Sharp TL, Katzenellenbogen JA, Welch MJ. Synthesis of an estrogen receptor beta-selective radioligand: 5- ^{18}F fluoro-(2R,3S)-2,3-bis(4-hydroxyphenyl)pentanenitrile and comparison of in vivo distribution with 16α - ^{18}F fluoro- 17β -estradiol. *J Med Chem* 2005;48(20):6366-6378.
- [27] Whitten WK. Occurrence of anoestrus in mice caged in groups. *J Endocrin* 1959;18:102-107.
- [28] Peterson LM, Kurland BF, Linka JM, Schubert MK, Stekhova S, Linden HM, Mankoff DA. Factors influencing the uptake of ^{18}F -fluoroestradiol in patients with estrogen receptor positive breast cancer. *Nucl Med Biol* 2011 38:969-978.

3. Article 2:

Suivi quantitatif d'hormonothérapies sur un modèle de souris porteuses de tumeurs ER+ ou ER α KD par imagerie TEP au FDG et à la [11 C]-méthionine

Auteurs de l'article: Michel Paquette, Sébastien Tremblay, Roger Lecomte et François Bénard

Statut de l'article: Publié: European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Research (EJNMMI Res), 2:61, 2012 (DOI: 10.1186/2191-219X-2-61).

Avant-propos

Bien que ce manuscrit ait été revu et corrigé par l'ensemble des co-auteurs, le design expérimental, l'écriture du texte original, la conception des figures et le suivi des corrections tant des co-auteurs que des réviseurs a été fait entièrement par le premier auteur de cet article et auteur de la présente thèse (Michel Paquette). De plus, à l'exception de la synthèse des radiotraceurs FDG et [11 C]-méthionine (l'équipe du cyclotron, dont S.Tremblay), et des qPCR (le centre de RNomique de l'Université de Sherbrooke), l'ensemble du travail expérimental a été effectué par ce même Michel Paquette, avec assistance technique mineure de la part du personnel du centre d'imagerie. Dr Bénard et Dr Lecomte ont quant à eux supervisé les travaux, ce dernier étant l'auteur de correspondance de cet article.

Résumé

Dans le but d'étudier le rôle spécifique d'une modulation du récepteur d'estrogène α (ER α) dans la réponse tumorale à des agents de thérapie anti-hormonale, un suivi à court terme de souris porteuses de tumeurs en imagerie TEP au 2-désoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose (FDG) et à la [¹¹C]-méthionine ([¹¹C]-MET) a été effectué. Ainsi, les lignées MC7-L1 (ER+) et MC7-L1 ER α -« knockdown » (ER α KD) ont été implantées en sous-cutané à des souris Balb/c. Ces dernières ont ensuite été suivies par imagerie TEP au FDG ou à la [¹¹C]-MET aux jours 0, 7 et 14 suivant un traitement avec soit un antiestrogène pur (fulvestrant), un inhibiteur d'aromatase (letrozole), un modulateur sélectif des ER (tamoxifène), ou sans traitement (contrôle). La captation tumorale en pourcentage de dose injectée par gramme de tissu (%ID/g) de chaque radiotracer est mesurée à chaque temps d'imagerie. Ainsi, si la captation de FDG et de [¹¹C]-MET est similaire entre les tumeurs ER+ et ER α KD à tous les temps observés pour les groupes contrôles, les tumeurs ER α KD ont une captation plus élevée que les tumeurs ER+ après 7 et 14 jours des différentes thérapies, reproduisant un comportement similaire à des tumeurs résistantes aux hormonothérapies. De plus, en parallèle, une analyse PCR quantitative (qPCR) a été effectuée sur les lignées cellulaires pour différents gènes reliés au cancer du sein (ER α , ErbB2, le récepteur de la progestérone (Pgr) et BRCA1). La baisse attendue et ciblée d'environ 60% d'ER α est accompagnée d'une diminution d'expression de Pgr et d'une surexpression de BRCA1 et ErbB2. Finalement, ces résultats indiquent que le modèle de souris porteuses de tumeurs ER+/ER α KD pourraient être adéquat pour tester des traitements d'antiestrogènes purs et d'inhibiteurs d'aromatase *in vivo* en préclinique. Aussi, ce modèle pourrait aider à élucider l'impact spécifique de l'expression d'ER α sur la réponse aux hormonothérapies.

Quantitative hormone therapy follow-up in an ER+/ER α KD mouse tumor model using FDG and [^{11}C]-methionine PET imaging

Michel Paquette¹

Email: Michel.Paquette@USherbrooke.ca

Sébastien Tremblay¹

Email: Sebastien.Tremblay@USherbrooke.ca

Francois Bénard²

Email: fbenard@bccrc.ca

Roger Lecomte^{1*}

* Corresponding author

Email: Roger.Lecomte@USherbrooke.ca

¹ Sherbrooke Molecular Imaging Center, Department of Nuclear Medicine & Radiobiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, 3001, 12th Avenue N., Sherbrooke, Québec J1H 5N4, Canada

² BC Cancer Agency Research Center, Department of Radiology, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia V5Z 1L8, Canada

Abstract

Background

The estrogen receptor α (ER α) is known to play an important role in the modulation of tumor response to hormone therapy. In this work, the effect of different hormone therapies on tumors having different ER α expression levels was followed up *in vivo* in a mouse model by PET imaging using 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose (FDG) and [¹¹C]-methionine ([¹¹C]-MET). A new model of MC7-L1 ER α -knockdown (ER α KD) tumor cell lines was designed as a negative estrogen receptor control to follow up the effects of changes in ER α expression on the early metabolic tumor response to different hormone therapies.

Methods

MC7-L1 (ER+) and MC7-L1 ER α -knockdown cell lines were implanted subcutaneously in Balb/c mice and allowed to grow up to 4 mm in diameter. Animals were separated into 4 groups ($n = 4$ or 5) and treated with a pure antiestrogen (fulvestrant), an aromatase inhibitor (letrozole), a selective estrogen receptor modulator (tamoxifen), or not treated (control). Tumor metabolic activity was assessed by PET imaging with FDG and [¹¹C]-MET at days 0 (before treatment), 7, and 14 after the treatment. Tumor uptake of each radiotracer in %ID/g was measured for each tumor at each time point and compared to tumor growth. Quantitative PCR (qPCR) was performed to verify the expression of breast cancer-related genes (ER α , ErbB2, progesterone receptor (PR), and BRCA1) in each tumor cell lines.

Results

While both ER+ and ER α KD tumors had similar uptake of both radiotracers without treatment, higher uptake values were generally seen in ER α KD tumors after 7 and 14 days of treatment, indicating that ER α KD tumors behave in a similar fashion as hormone unresponsive tumors. Furthermore, the ER α -specific

downregulation induced a slight PR expression decrease and overexpression of BRCA1 and ErbB2.

Conclusion

The results indicate that the proposed ER+/ER α KD tumor-bearing mouse model is suitable to test pure antiestrogen and aromatase inhibitor therapies *in vivo* in a preclinical setting and could help to elucidate the impact of ER α levels on tumor response to hormone therapy.

Keywords

breast cancer, tumor mouse model, estrogen receptor α , hormone therapy, small animal PET, FDG, [^{11}C]-methionine, quantitative PET.

Background

Hormone therapy has been successfully used to treat estrogen receptor positive (ER+) breast cancer for a few decades. About 70% of all breast cancers are ER+ and, thus, potentially sensitive to hormone therapies [1]. However, loss of positivity, reduction of the receptor expression, and/or loss of estrogen growth dependence (to name a few) can sometimes induce resistance to hormone therapy [2,3]. Other mechanisms of resistance were proposed, such as overexpression and crosstalk of growth factors and growth factor receptors with ER pathways [4-6]. Also, a significant proportion of ER+ tumors fails to respond to some or all hormone treatments [1,7]. Hence, the contribution of estrogen receptor expression levels to the mechanisms of resistance is yet to be elucidated. Moreover, with the development of new hormone therapy agents, and data yet missing on existing therapies, a suitable animal model to test the potential of these treatments is lacking but would be essential for a better understanding of the ER role in hormone therapy.

To evaluate the impact of relatively different estrogen receptor α (ER α) expression on hormone treatments, MC7-L1 cells received a shRNA sequence targeting specifically the ER α mRNA using a lentiviral vector, thus creating an MC7-L1 ER α -knockdown (ER α KD) cell line with roughly 50% to 60% drop in ER expression. These cell lines have been previously described and characterized [8,9]. MC7-L1 tumors are already known to respond to different hormone treatments [10,11]. The comparative follow-up of ER+ and ER α KD tumors could therefore become a powerful preclinical tool to test new drugs targeting the estrogen receptors.

Since there are three main classes of estrogen hormone therapy (pure antiestrogen, aromatase inhibitor, and selective estrogen receptor modulator (SERM)), it was deemed important to test the proposed ER+/ER α KD tumor-bearing mouse model with at least one well-known drug of each class. Hence, fulvestrant, letrozole, and tamoxifen have been used in this study. With each class

of drug having a different mechanism of action (that is, ER antagonist, estrogen synthesis inhibitor, and partial ER agonist, respectively), the study will provide a good indication of whether or not this ER+/ER α KD model has a universal potential in testing hormone treatments.

Small animal positron emission tomography (PET) imaging allows the non-invasive follow-up of a number of conditions in a preclinical setting. It has been used to study the expression of estrogen receptors [9,10] as well as to assess the effect of chemotherapy and hormone therapy in mammary carcinoma tumor models [11]. In the present study, 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose (FDG) and [¹¹C]-methionine ([¹¹C]-MET) were chosen for the complementary data they supply on the metabolic state for the fate of the tumor. While FDG is a well-known glucose analog tracer, [¹¹C]-MET is mainly incorporated into the newly synthesized proteins of tumor cells. A proliferation tracer such as 3'-deoxy-3'-[¹⁸F]fluorothymidine ([¹⁸F]-FLT) would have been another option to assess tumor growth rate, but thymidine analogs are known to have a poor specific uptake in rodent models without *in vivo* enzymatic degradation of endogenous thymidine [12,13], or the use of human tumors in a nude mouse model [14,15]. However, since protein synthesis is at a peak at the S phase of the cell cycle, [¹¹C]-MET uptake has been reported to somewhat correlate with the Ki67 cell proliferation index [16], proliferating cell nuclear antigen index [17], and S-phase fraction of cell population [18]. Hence, the [¹¹C]-MET uptake can be used as an indirect, yet useful, indicator of the proliferative state of a tumor at a given time in rodent models.

In this study, the novel ER+/ER α KD tumor-bearing mouse model was investigated by PET imaging as a preclinical tool to follow up hormone therapies. Three different classes of estrogen hormone therapy were monitored in comparison to controls for their effect on the short-term metabolic response of tumors using both FDG and [¹¹C]-MET PET scans. In parallel, a preliminary comparison of the gene expression patterns in ER+ and ER α KD tumors was

performed by quantitative PCR (qPCR) to better characterize the different tumor cell lines.

Methods

Cell line modification

The human cell line 293T received via lipofectamine transfection 7.5 μg of the plp1, plp2, and plp/VSV-G plasmids (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 7.5 μg pLKO.1-puro plasmid containing a shRNA sequence targeting the murine ER α (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA). After 48-h incubation, the lentivirus-rich supernatant (cell media) was taken and filtered with a 0.45- μm filter then kept at -80°C for further use.

MC7-L1 cell line (murine mammary ductal carcinoma, ER+, described in [8]) was infected by an aliquot of the virus-enriched supernatant containing 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polybrene. The next day, cells were incubated for at least 1 week in DMEM containing 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of puromycin as the selection agent. Puromycin-resistant cells were expanded and further tested to see if the expression of the ER α gene was knocked down (ER α KD). Characterization of the ER status of the two cell lines by Western blot, qPCR, [^3H]-estradiol saturation curves, and 16 α -[^{18}F]fluoro-17 β -estradiol PET imaging were described earlier [9]. All manipulations were performed following containment level 2 procedures.

qPCR

Expression levels of ER α , BRCA1, ErbB2, and PR mRNA were obtained by real-time PCR. Total RNA extractions were performed on cell pellets with the RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) as recommended by the manufacturer, with DNase treatments. RNA integrity was assessed with an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Reverse transcription was performed on a maximum of 2 μg total RNA with transcriptor

reverse transcriptase, random hexamers, dNTPs (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), and 10 units of RNaseOUT (Invitrogen) following the manufacturer's protocol in a total volume of 20 μ l. All forward and reverse primers were individually resuspended to 20- to 100- μ M stock solution in Tris-EDTA buffer (IDT) and diluted as a primer pair to 1 μ M in RNase DNase-free water (IDT). qPCR reactions were performed in 10 μ l in 96 well plates on a Realplex 2 thermocycler (Eppendorf, Westbury, NY, USA) with 5 μ l of 2X FastStart Universal SYBR Green Master mix (Roche Diagnostics), 10 ng (3 μ l) cDNA, and 200 nM final (2 μ l) primer pair solutions. The following cycling conditions were used: 10 min at 95°C; 50 cycles: 15 s at 95°C, 30 s at 60°C, and 30 s at 72°C. Relative expression levels were calculated using the qBASE framework [19] and the housekeeping genes UBC, HPRT1, and GAPDH for mouse cDNA. Primer design and validation were evaluated as described elsewhere [20]. In every qPCR run, a template free control was performed for each primer pair, and these were consistently negative.

Relative quantification was achieved by attributing the arbitrary value of 1.0 to one of the three ER⁺ samples for each gene; the 2 other ER⁺ samples and the 3 ER α KD samples were then compared to this value. Average \pm standard deviation of each triplicate was then used to express the relative expression level of ER⁺ and ER α KD cell lines for each monitored gene.

Animals

The animal experiments were conducted according to the recommendations of the Canadian Council on Animal Care and the in-house Ethics Committee for Animal Experiments. MC7-L1 tumors (ER⁺ and ER α KD) were inoculated subcutaneously (1×10^7 cells) in the axillary area of Balb-c mice (Charles River, Montreal, Canada). Implantation of the tumors was performed under anesthesia (13 mg/ml ketamine, 86 mg/ml xylazine; 1 ml/kg, i.p.). The tumors were grown up to 3 to 4 mm in diameter (21 to 25 days post-implantation) before initiating the PET scan schedule together with the different treatment regimens.

Treatment regimen

One group of tumor-bearing mice received a unique subcutaneous 0.5-mg injection of fulvestrant (Sigma-Aldrich, I4409) immediately after the end of the day 0 PET scan. A *per diem* oral administration of 5 mg/kg letrozole (Femara pills (Novartis Pharmaceuticals Canada Inc., Dorval, Canada) containing 2.5 mg letrozole, dissolved in appropriate volume) was given to a second group of mice from day 1 to day 14. A third group received after the first scan a *per diem* oral dose of 8 mg/kg tamoxifen (Sigma-Aldrich, T5648). Finally, a control group without treatment served to monitor the normal *in vivo* growth and radiotracer uptake of both types of tumors. Tumor growth was monitored by caliper measurements at days 0, 7, and 14 and calculated in mm³ using the formula $0.524 \times (\text{width})^2 \times \text{length}$ for each group [21].

Radiochemistry

Fluorine-18 was prepared by the $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ reaction on ^{18}O -enriched water as target material using a TR-19 cyclotron (ACSI, Vancouver, Canada). [^{11}C]-carbon dioxide was prepared by the $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$ reaction on a gas mixture of 99.5% nitrogen and 0.5% oxygen as target, also using the TR-19 cyclotron. The methods used for the synthesis of FDG [22] and [^{11}C]-MET [23] have been described elsewhere.

PET imaging

The mice, under isoflurane anesthesia (1% at 2 l/min oxygen flow) for at least 30 min, were placed in prone position on the bed of a LabPETTM small animal PET scanner (Gamma Medica, Northridge, CA, USA), having a 3.75-cm axial field of view and achieving 1.35-mm resolution [24]. One group of mice for each treatment regimen (and the untreated control group) was imaged 30 min after the i.v. injection (via the caudal vein) of 20 to 24 MBq [^{18}F]-FDG. Image acquisition was performed for 15 min with the tumors centered in the scanner field of view. Another group received an injection of 20 to 24 MBq [^{11}C]-MET in the caudal vein, and 10 min later, the mice were imaged during 20 min. All image acquisitions were

performed with dual axial sampling positions to improve image uniformity and resolution in the axial direction. Due to logistic constraints, two different groups were used for either FDG or [^{11}C]-MET imaging.

The images were reconstructed using 20 iterations of a 2D MLEM algorithm implementing a physical description of the detector responses in the system matrix [25]. Quantification of the tumor uptake was performed using the in-house LabTEP image analysis software. The FDG and [^{11}C]-MET signals were estimated by searching the highest 2×2 cluster of voxels within the tumor ROI. The background from circulating radiotracer and non-specific tissue uptake was estimated from a reference ROI placed on the muscular tissues. This average background count rate was subtracted from the tumor peak count rate to obtain the net tumor uptake. After each scan sequence, a cylindrical phantom that approximates the size of a mouse (24.8 ml, 26-mm diameter \times 47-mm axial length) containing a known quantity of ^{18}F (≈ 20 MBq FDG) was used to obtain a calibration factor to convert the counts per second into absolute activity measurements in kilobecquerel, from which the injected dose per gram of tissue (%ID/g) values were derived. A density of 1 g/cc was used to convert the fractional uptake per volume into %ID/g. The uptake values were not corrected for partial volume averaging effects as the tumor size was above the threshold (>3 -mm diameter or >14 -mm³ sphere) for which recovery correction factors become necessary using the LabPET™ scanner.

Statistical analysis

Standard deviation of the mean was used to determine the spread of data around the mean. Although the data sets are relatively small (four or five per group), it is assumed that they follow a normal distribution. Therefore, a paired two-tailed Student's *t* test was used to evaluate uptake differences between ER+ and their corresponding (in the same animal) ER α KD tumors using a probability threshold of $p = 0.05$ for significance. For comparison between the different

treatment groups and the control group, an unpaired two-tailed Student's *t* test was used, with a probability threshold of $p = 0.05$.

Results

Tumor growth during treatment

Caliper measurements were taken at each time point for each treatment group to assess the effects of the hormone therapies on the growth rate of the two different tumors during the short (14 days) time scale of the study (Figure 1). While both tumor types grew at a very similar rate in the absence of treatment (control group), or under letrozole or tamoxifen treatment, ER+ tumors grew significantly slower than ER α KD tumors after 14 days of fulvestrant treatment ($p < 0.05$). Letrozole treatment caused a non-significant trend ($p = 0.07$) towards growth inhibition of ER+ tumors compared to ER α KD tumors after 14 days. Moreover, MC7-L1 tumors treated with fulvestrant for 14 days had their growth significantly inhibited compared to the control ($p < 0.05$), letrozole ($p < 0.05$), and tamoxifen ($p < 0.01$) groups at 14 days. The other treatments failed to differentiate the growth of either tumors compared to control ($p > 0.21$). Attempts to follow tumor growth for a longer time resulted in the animals reaching endpoints (partial paralysis, growth-related necrosis of the tumor, etc.) well before day 21. Under therapy, ER α KD tumors were the cause for reaching endpoints most of the time.

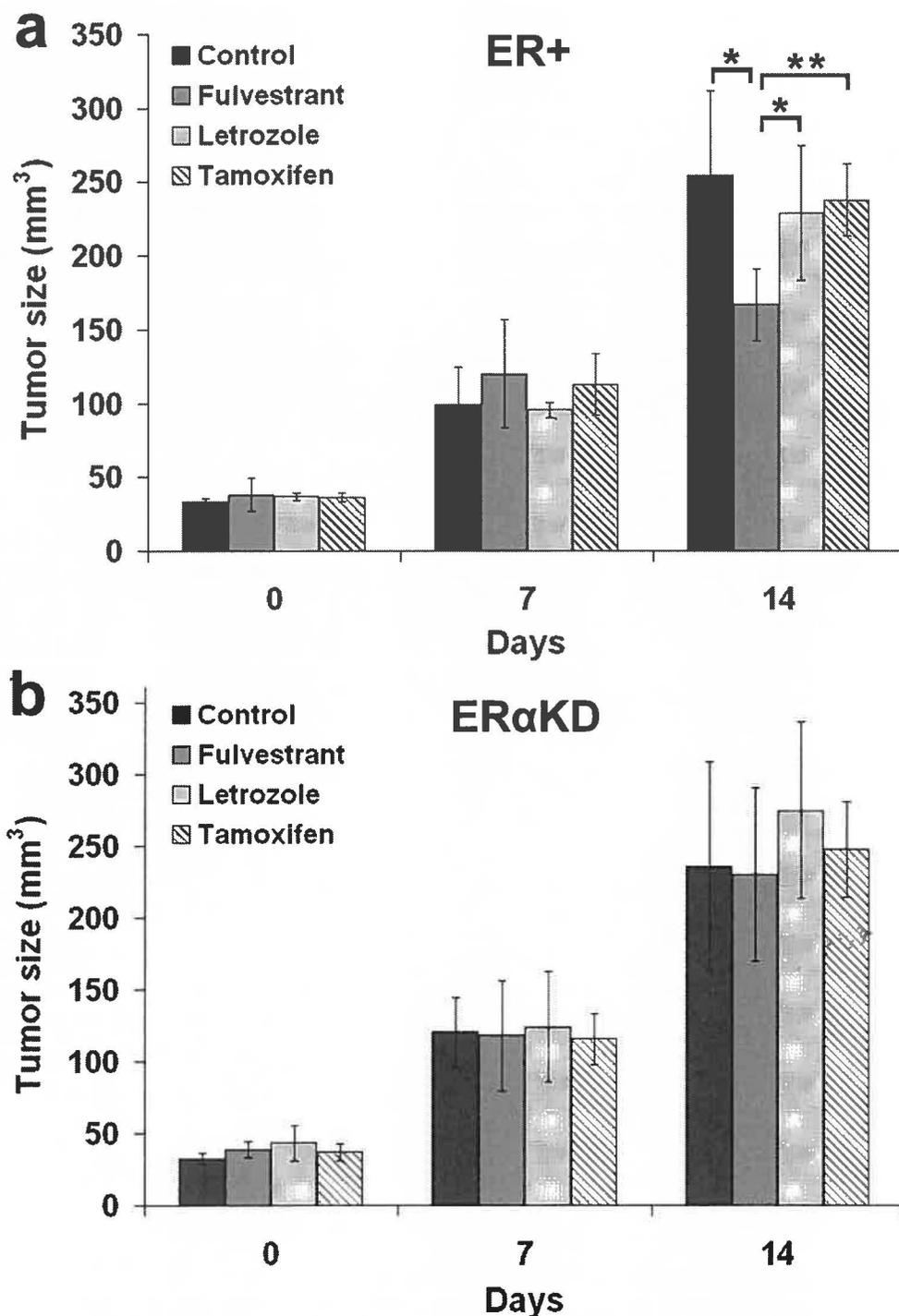


Figure 1 Caliper growth follow-up measurements. MC7-L1 ER+ (a) and ER α KD (b) tumor growth were measured under fulvestrant, letrozole, or tamoxifen therapy, or no treatment (control). Measurements were done at 0, 7, and 14 days following the same time points as the imaging protocol ($n = 5$ for each group). Asterisk denotes $p < 0.05$; double asterisk, $p < 0.01$.

Comparative qPCR

Comparative qPCR of ER⁺ and ER α KD cell lines was performed on a sample of relevant genes (ErbB2, BRCA1, PR, and of course ER α) to verify if the specific knockdown of ER α affected the expression of other breast cancer-related genes (Figure 2). The shRNA dependent 60% drop of the ER α in the ER α KD cell line (as compared to ER⁺, $p < 0.0001$) is accompanied by a slight but significant decrease of estrogen-dependent PR expression ($p < 0.005$) and also by a 1.5-fold increase of BRCA1 mRNA levels ($p < 0.05$) and by a 2.5-fold rise of ErbB2 mRNA levels ($p < 0.0005$).

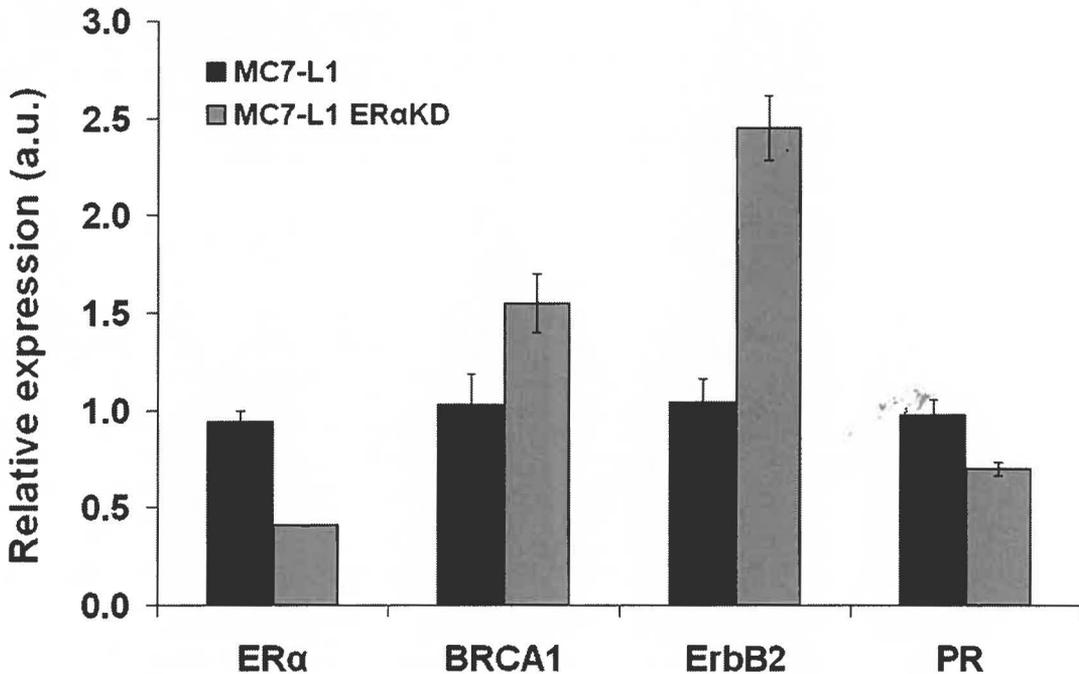


Figure 2 Comparative qPCR. Murine ER α , BRCA1, ErbB2, and PR mRNA expression were compared in MC7-L1 ER⁺ and ER α KD cell lines. RNA extraction was performed in triplicate for each cell line, and each qPCR reaction (each sample, each gene) was repeated thrice. Data were expressed relative to one of the three MC7-L1 samples for each gene.

FDG PET images and quantification

Selected results of the 14-day follow-up study performed using FDG on ER+ and ER α KD tumors in the different groups (control, fulvestrant, letrozole, and tamoxifen) are shown in Figure 3. For the control group ($n = 5$), the uptake increased gradually with time, and no significant differences in the uptake value ($p > 0.33$) were seen between ER+ and ER α KD tumors (Figure 4a).

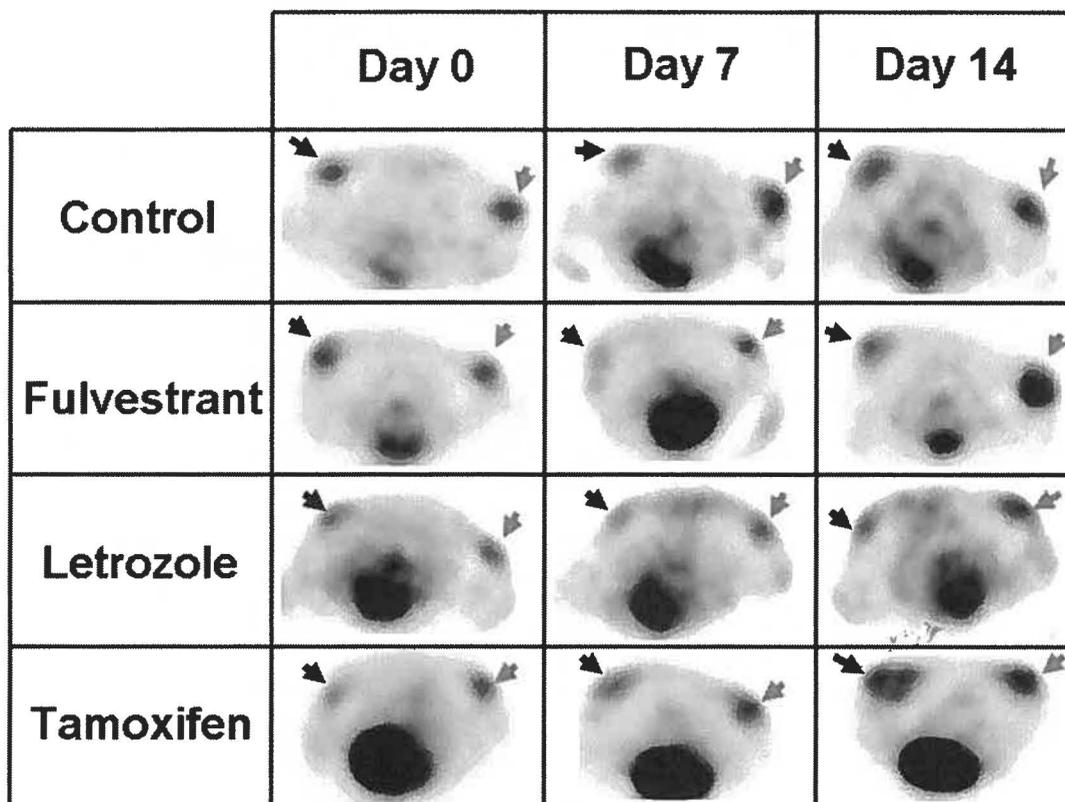


Figure 3 Representative transaxial slices of FDG PET images. Images were taken at days 0, 7, and 14 after the start of a treatment regimen (control, 0.5 mg fulvestrant, 5 mg/kg/day letrozole, and 8 mg/kg/day tamoxifen). Black arrows indicate ER+ tumors; gray arrows, ER α KD tumors.

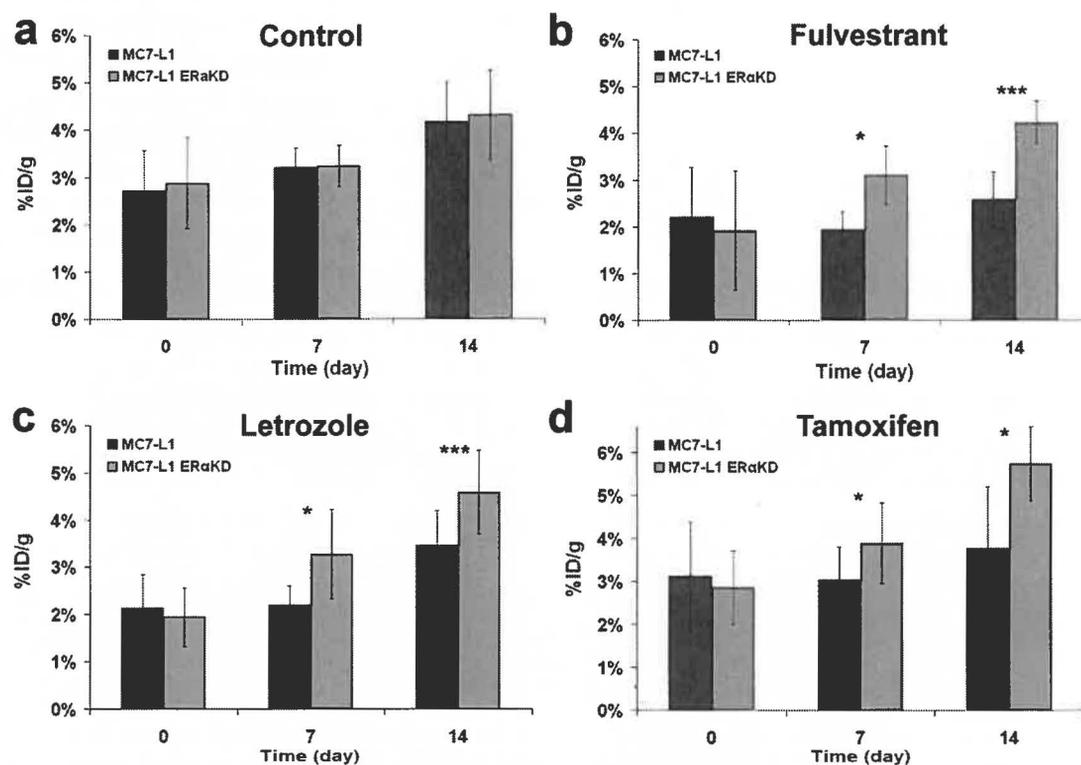


Figure 4 Quantitative measurements of FDG tumor uptake (expressed in %ID/g). Uptake in MC7-L1 ER+ and ER α KD tumor-bearing mice was measured at days 0, 7, and 14 after the start of the treatment (control, $n = 5$ (a); fulvestrant, $n = 4$ (b); letrozole, $n = 5$ (c); tamoxifen, $n = 5$ (d)). Asterisk denotes $p < 0.05$; triple asterisk, $p < 0.005$.

With the fulvestrant treatment ($n = 4$, Figure 4b), significant uptake differences were observed by FDG PET imaging between ER+ and ER α KD tumors at day 7 ($p < 0.05$) and day 14 ($p < 0.005$), whereas the same trend ($p < 0.05$ at day 7, $p < 0.005$ at day 14) was observed using letrozole ($n = 5$, Figure 4c). For the tamoxifen group ($n = 5$, Figure 4d), ER α KD tumors had a statistically significant higher uptake than ER+ tumors at days 7 and 14 (both at $p < 0.05$).

[¹¹C]-MET PET images and quantifications

Parallel to the FDG study, the 14-day follow-up of the different treatment groups was performed using [¹¹C]-MET PET imaging (Figure 5). As with FDG, the [¹¹C]-MET control group ($n = 5$) showed a progressive increase of uptake between day 0 and day 14, with both ER+ and ER α KD tumors having no significant uptake differences ($p > 0.16$) throughout the follow-up period (Figure 6a).

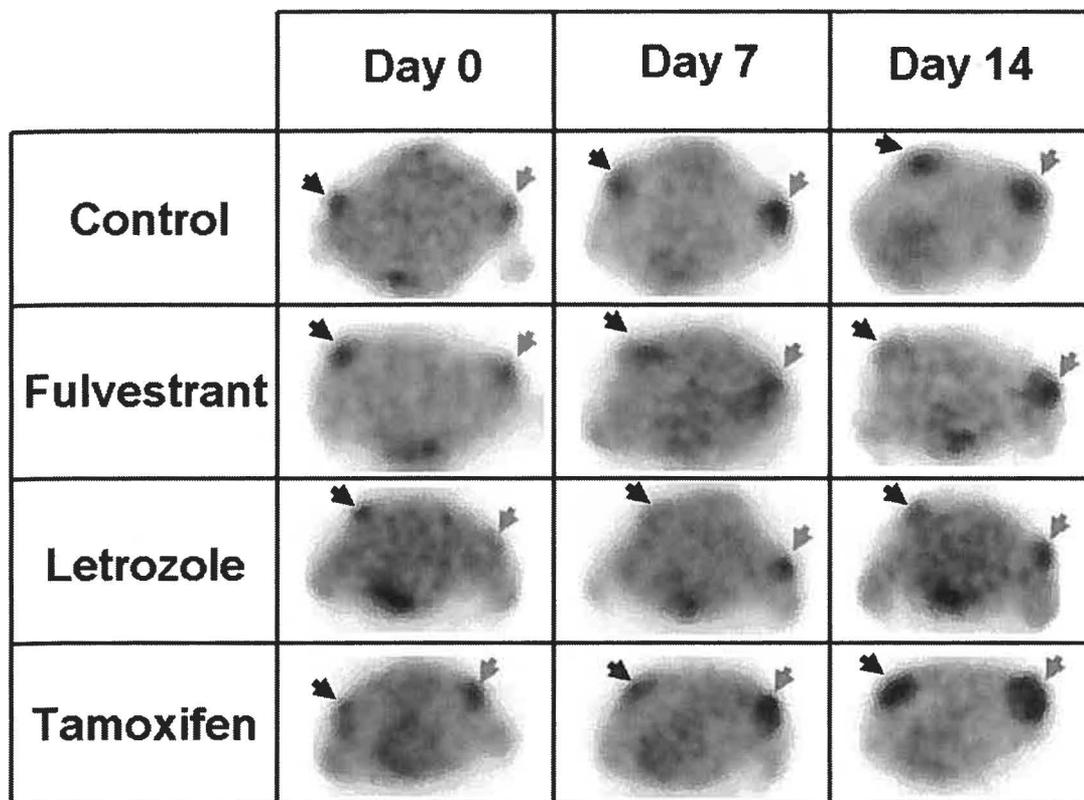


Figure 5 Representative transaxial slices of [¹¹C]-MET PET images. Images were taken at days 0, 7, and 14 after the start of a treatment regimen (control, 0.5 mg fulvestrant, 5 mg/kg/day letrozole, and 8 mg/kg/day tamoxifen). Black arrows indicate ER+ tumors; gray arrows, ER α KD tumors.

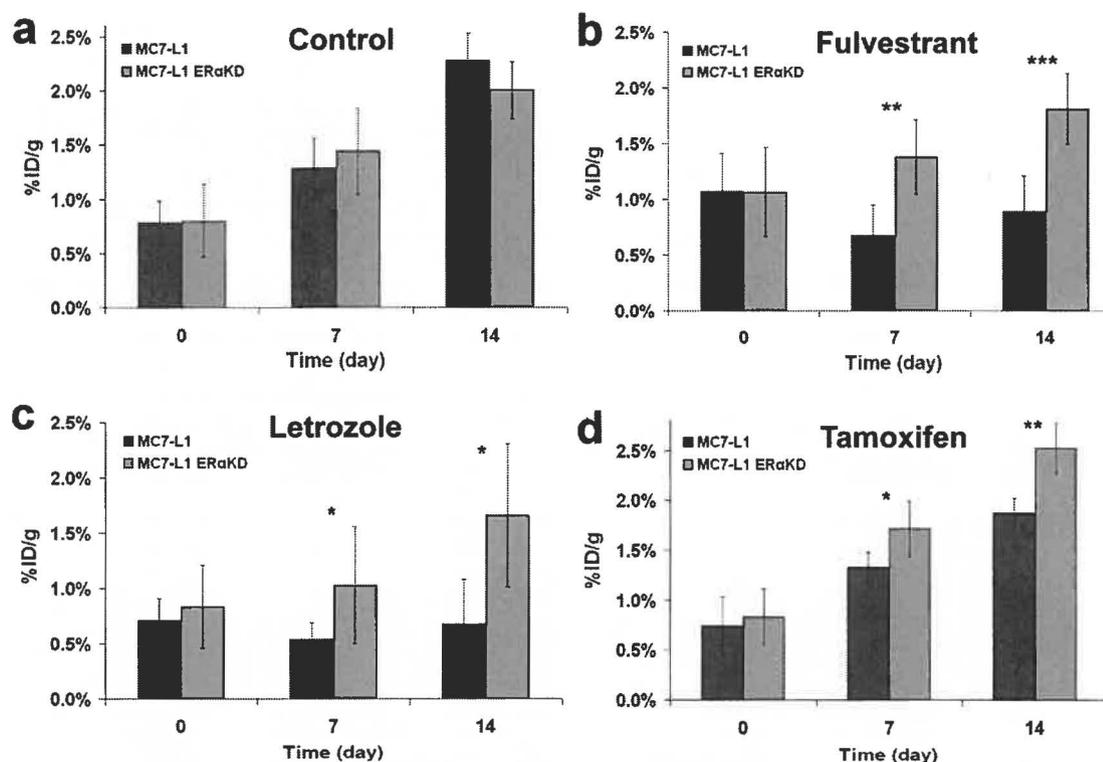


Figure 6 Quantitative measurements of [^{11}C]-MET tumor uptake (expressed in %ID/g). Uptake in MC7-L1 ER $^{+}$ and ER α KD tumor-bearing mice was measured at days 0, 7, and 14 after the start of the treatment (control, $n = 5$ (a); fulvestrant, $n = 5$ (b); letrozole, $n = 4$ (c); tamoxifen, $n = 5$ (d)). Asterisk denotes $p < 0.05$; double asterisk, $p < 0.01$; and triple asterisk, $p < 0.005$.

[^{11}C]-MET uptake was clearly higher in ER α KD tumors, as compared to ER $^{+}$ tumors, at day 7 ($p < 0.01$) and day 14 ($p < 0.005$) during the course of the fulvestrant treatment ($n = 5$, Figure 6b). Similarly, the follow-up of letrozole therapy ($n = 4$, Figure 6c) using [^{11}C]-MET PET also showed a significant uptake difference favoring ER α KD tumors at day 7 and day 14 (both at $p < 0.05$). Following the same trend, ER α KD tumors had a significantly higher uptake than ER $^{+}$ tumors at day 7 ($p < 0.05$) and day 14 ($p < 0.01$) during the tamoxifen treatment ($n = 5$, Figure 6d).

Uptake of treated versus untreated groups

In order to assess the therapeutic effect of the different medications tested on both types of tumors, the uptake of each treated group was compared to the

values from the untreated group obtained with the same tracer. Hence, for the FDG measurements of the ER+ tumor response (Figure 7a), the uptake was significantly lower than the control group for fulvestrant at day 7 ($p < 0.005$) and day 14 ($p < 0.01$), and for letrozole at day 7 ($p < 0.05$). A near significant trend towards lower than the control uptake could be seen at day 14 of letrozole therapy for ER+ tumors ($p = 0.067$). As for tamoxifen treatment, no difference was observed for ER+ tumor compared to the control group (day 7, $p = 0.33$; day 14, $p = 0.48$). On the other hand, ER α KD tumors under fulvestrant and letrozole therapies, followed-up by FDG (Figure 7c), were undistinguishable from the control group (p varying between 0.30 and 0.85), although there was a non-significant trend towards a higher uptake than the control for tamoxifen therapy ($p = 0.08$ for day 7, $p = 0.06$ for day 14).

Using [^{11}C]-MET measurements of tumor response, a similar pattern to FDG was observed. Indeed, ER+ tumors (Figure 7b) treated with fulvestrant had a lower uptake than the control group ($p < 0.005$ at day 7, $p < 0.01$ at day 14). Similar results were observed using letrozole ($p < 0.005$ at day 7, $p < 0.01$ at day 14). Again, tamoxifen did not affect the [^{11}C]-MET uptake of ER+ tumors compared to the untreated group (day 7, $p = 0.42$; day 14, $p = 0.31$). For ER α KD tumors (Figure 7d), there was no significant [^{11}C]-MET uptake differences between the treated and untreated groups (p varying between 0.12 and 0.39), with the exception of tamoxifen at day 14, where a higher than control uptake is observed ($p < 0.01$).

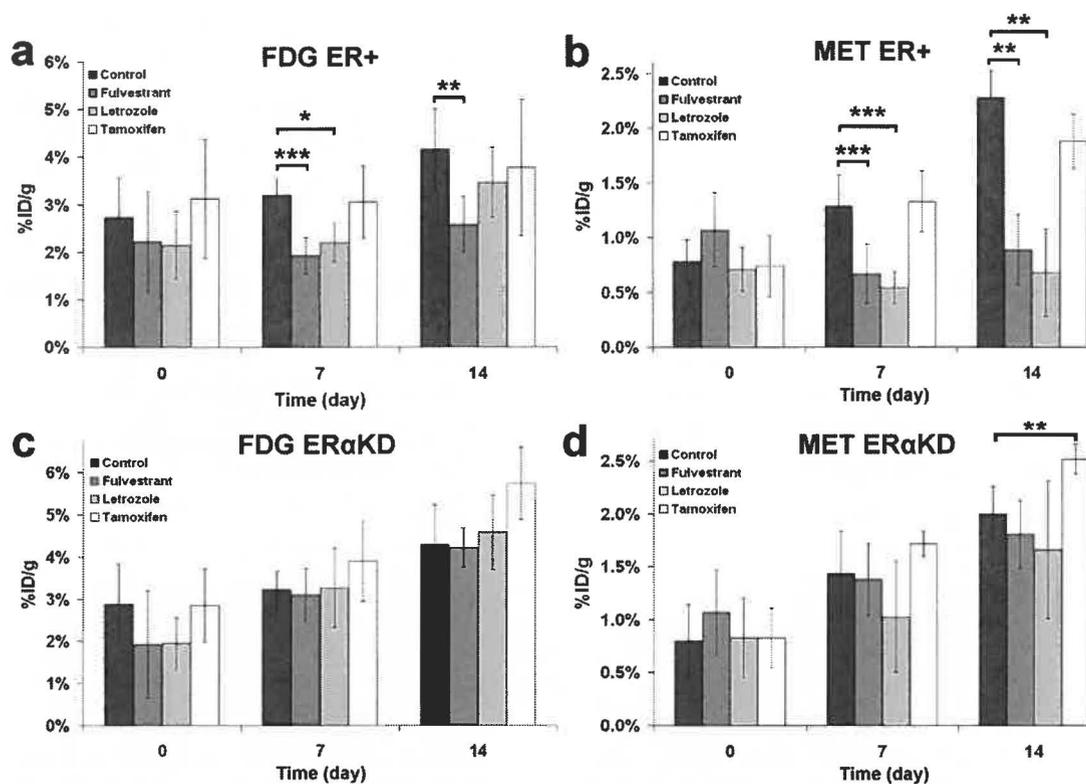


Figure 7 Comparison of %ID/g uptake in the control group and the three treatment groups. Uptake was compared for ER+ tumors imaged with FDG (a) and [^{11}C]-MET (b) and for ER α KD tumors imaged by PET with FDG (c) and [^{11}C]-MET (d). Asterisk denotes $p < 0.05$; double asterisk, $p < 0.01$; and triple asterisk, $p < 0.005$.

Discussion

In this study, the short-term (14 days) follow-up of three different estrogen hormone therapies on a novel ER+/ER α KD mouse tumor model was performed by means of FDG and [^{11}C]-MET PET imaging. Each of these treatments represents one of the three main classes of hormone therapy, each class having a different mechanism of action (partial agonist, pure antagonist, or aromatase inhibitor). At the same time, the use of FDG and [^{11}C]-MET allowed different information related to the glycolytic activity and protein synthesis rate to be obtained to better characterize the tumor fate.

The sensitivity of MC7-L1 tumors to tamoxifen and letrozole hormone therapies (among other therapies) was already evaluated by caliper measurements in a previous study [10]. A growth inhibition was observed after 6 to 7 weeks of treatment, as compared to the untreated group, with the therapies beginning at the time of implantation of the tumors. It was then concluded that MC7-L1 tumors were responsive to hormone therapy treatments. Another study followed up letrozole treatment and chemotherapy on MC7-L1 and MC4-L2 tumorbearing mouse models using FDG PET [11]. However, tumors were grown up to at least 6-mm diameter ($\approx 100 \mu\text{l}$) before the start of the treatments, and evident signs of necrosis were seen on PET images during follow-up and, in some cases, even at day 0. A more recent investigation using spontaneously occurring mammary STAT1 $-/-$ tumors in a mouse model employed FDG and steroid receptor PET imaging to follow up hormone therapies [26]. Using this model, a significant drop in FDG tumoral uptake was observed 2 weeks after administration of 5 mg/week of fulvestrant (a tenfold higher dosage), with treatment beginning 23 days after tumor implantation. In contrast to our study, this work was mainly focused on the assessment of steroid receptor modulation by PET under hormone therapy.

In the present work, treatments began at 21 to 25 days after tumor implantation, hence more representative of a therapeutic protocol than a prophylactic or adjuvant setting. In these conditions, follow-up could hardly be pursued for a longer time period than 14 days because endpoints were reached (most of the time, due to ER α KD tumors). Besides, tumors would begin to show signs of necrosis, which could have influenced tumor uptake for other reasons than treatment efficacy. However, a short-term reduction of FDG and [^{11}C]-MET uptake (after 7 and 14 days of treatment) was clearly observed in the MC7-L1 ER $^{+}$ tumor when using fulvestrant or letrozole treatment compared to the control group (with the exception of letrozole followed by FDG at day 14, where a non-significant reduction was observed). Moreover, both tracers succeeded in differentiating the ER $^{+}$ tumor from the ER α KD tumor at days 7 and 14, regardless of the treatment used.

On the other hand, the ER α -knockdown variant of the MC7-L1 cell line did not have such uptake inhibition when under therapy, which could be the direct result of ER α downregulation. Nevertheless, other studies suggest that one of the main factors responsible for hormone therapy resistance is the overexpression of EGFR and ErbB2 (Her2), which not only can crosstalk with ER α signaling [27] but also can act as a compensation mechanism [28]. For instance, letrozole-resistant MCF-7 tumors were reported to have a fourfold increase in ErbB2 expression compared to control tumors [29]. Moreover, combination therapy using both letrozole and trastuzumab in an aromatase-transfected MCF-7 xenograft model reversed letrozole resistance and sensitized the tumors to estrogen, further supporting the role of Her2 in hormone resistance [28]. Interestingly, the ER α -specific knockdown in our MC7-L1 cell line provoked a 2.5-fold increase in ErbB2, which could also be another reason why the ER α KD tumors resisted hormone treatments (as assessed by FDG and [11 C]-MET uptakes).

Tamoxifen therapy gave ambiguous results: on one hand, FDG and [11 C]-MET uptakes were significantly lower in wild-type MC7-L1 tumors than in their ER α KD counterpart after 7 and 14 days of treatment, hence supporting that these tumors reacted differently under hormone therapy. On the other hand, there were no significant differences between the uptake of the tamoxifen group and the control group, with the exception of [11 C]-MET, day 14, where ER α KD tumors had actually higher uptake than the control group. Tamoxifen therapy is known to induce a short-term metabolic flare, a phenomenon already reported in FDG PET follow-up studies [30], which could well be observed in the present study. Hence, although the tamoxifen dose (8 mg/kg/day) used in this study was found optimal for growth inhibition of the MC7-L1 tumor in a previous study [10] and other doses tested in the present study were either ineffective (4 mg/kg/day) or growth- and uptake-stimulating (16 mg/kg/day, data not shown), it can be concluded that this model and methodology are limited in their capacity to evaluate SERM therapies on a short time scale.

FDG and [^{11}C]-MET PET imaging was successful in distinguishing ER+ from ER α KD tumors treated with the different hormone therapies and in assessing early treatment efficacy of ER+ tumors for fulvestrant and letrozole in most cases. It is noteworthy that a glucose analog tracer and a protein synthesis/amino acid transport tracer uptake both follow the same trend throughout the different therapies. On the other hand, this is not surprising, considering that a clinical study using FDG and [^{11}C]-MET PET with various types of tumors has shown a good correlation ($R = 0.79$) between the uptake of these two tracers [31]. Not unexpectedly, growth follow-up of these tumors was much less successful in monitoring an effect of these therapies on such a short time scale. With the exception of fulvestrant on day 14, where a significant size difference was observed between ER+ and ER α KD tumors and between treated and untreated ER+ tumors, no other effect could be observed using caliper measurements. On a longer time scale, it is already known that letrozole and tamoxifen induce a growth inhibition for treated compared to untreated MC7-L1 tumors [10]. Our results support the fact that an earlier evaluation of therapy success than growth follow-up can be obtained with FDG and [^{11}C]-MET PET, at least for the fulvestrant and letrozole treatments.

Interestingly, despite the fact that the ER α -specific downregulation induced varying expression patterns in the studied genes (and probably in other unmonitored genes), MC7-L1 ER α KD displayed a phenotype that was very similar to the parental cell line. Indeed, the morphology of the cells, the uptake of metabolic PET tracers, and the *in vivo* and *in vitro* growth rates were all comparable between the two cell lines, with the notable phenotypic exception of how they withstand hormone therapy. To explain this phenotype, it seems likely that the residual ER α activity, together with the contribution of ER β activity, was sufficient to maintain the estrogen signaling pathways at a suitable level to allow normal growth. Alternatively, ErbB2 overexpression could also somewhat compensate for the partial loss of ER α .

Finally, the ER+/ER α KD mouse tumor model, combined with FDG and [^{11}C]-MET PET imaging, would represent a valuable test bench for new ER-specific therapies [32,33] or for optimizing the dose regimen and administration protocols of existing antiestrogen or aromatase inhibitor therapies. Even though no clear outcome of tamoxifen treatments could be demonstrated, the proposed tumor model could still be useful to investigate the SERM action mechanisms. Moreover, it could also be used to test whether new treatments and protocols are effective against hormone therapy-resistant tumors [27]. In parallel, wider and more detailed gene expression comparisons would help to better characterize ER+ and ER α KD cell lines.

Conclusion

Using a novel ER+/ER α KD murine breast tumor model, different estrogen hormone therapies were evaluated longitudinally (on a short-term 14-day schedule) using FDG and [^{11}C]-MET PET imaging. With this new model, it was possible to observe that letrozole and fulvestrant treatments reduced glucose uptake/consumption and protein synthesis in ER+ tumors, but not so in ER α KD tumors, on this short time scale. Although tamoxifen treatment showed differences in response between both tumor types, comparison with the control group was inconclusive. Altogether, the proposed ER+/ER α KD tumor-bearing mouse model provides a promising preclinical platform to investigate novel ER-specific therapies using PET imaging.

Authors' contributions

MP laid out the study design, carried out the experimental procedures, performed the statistical analysis, and drafted the report. ST carried out the synthesis of [^{11}C]-methionine and participated in the coordination of the project. FB and RL participated in the design and coordination of the study and helped draft and correct the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We thank Jean-François Beaudoin and Jules Cadorette for operating and maintaining the LabPET™ scanner. We also thank the Université de Sherbrooke RNomics Centre for the qPCR experiments and analysis. This project was supported by the Canadian Breast Cancer Research Alliance grant number 015388 and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grant number MOP-86717. The Sherbrooke Molecular Imaging Center is part of the Étienne-Le Bel Clinical Research Center funded by Le Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQ-S).

References

1. McGuire WL: **Hormone receptors: their role in predicting prognosis and response to endocrine therapy.** *Semin Oncol* 1978, **5**:428-433.
2. Johnston SR, Haynes BP, Smith IE, Jarman M, Sacks NP, Ebbs SR, Dowsett M: **Acquired tamoxifen resistance in human breast cancer and reduced intratumoral drug concentration.** *Lancet* 1993, **342**:1521-1522.
3. Lykkesfeldt A: **Mechanisms of tamoxifen resistance in the treatment of advanced breast cancer.** *Acta Oncol* 1996, **S5**:9-14.
4. Gutierrez MC, Detre S, Johnston S, Mohsin SK, Shou J, Allred DC, Schiff R, Osborne CK, Dowsett M: **Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase.** *J Clin Oncol* 2005, **23**(11):2469-2476.
5. Nicholson RI, Staka C, Boyns F, Hutcheson IR, Gee JM: **Growth factor-driven mechanisms associated with resistance to estrogen deprivation in breast cancer: new opportunities for therapy.** *Endocr Relat Cancer* 2004, **11**:623-641.
6. Schiff R, Osborne CK: **New insight into estrogen receptor- α function and its implication for endocrine resistance in breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2005, **7**:205-211.
7. Osborne CK, Fuqua SA: **Mechanisms of tamoxifen resistance.** *Breast Cancer Res Treat* 1994, **32**:49-55.
8. Lanari C, Lüthy I, Lamb CA, Fabris V, Pagano E, Helguero LA, Sanjuan N, Merani S, Molinolo AA: **Five novel hormone-responsive cell lines derived from murine mammary ductal carcinomas: *in vivo* and *in vitro* effects of estrogens and progestins.** *Cancer Res* 2001, **61**:293-302.
9. Paquette M, Ouellet R, Archambault M, Croteau E, Lecomte R, Bénard F: **[¹⁸F]-Fluoroestradiol (FES) quantitative PET imaging to differentiate ER+ and ER α -knockdown breast tumors in mice.** *Nucl Med Biol* 2012, **39**:57-64.

10. Aliaga A, Rousseau JA, Ouellet R, Cadorette J, van Lier JE, Lecomte R, Bénard F: **0Breast cancer models to study the expression of estrogen receptors with small animal PET imaging.** *Nucl Med Biol* 2004, **31**(6):761-770.
11. Aliaga A, Rousseau JA, Cadorette J, van Lier JE, Lecomte R, Bénard F: **A small animal positron emission tomography study of the effect of chemotherapy and hormonal therapy on the uptake of 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D-glucose in murine models of breast cancer.** *Mol Imaging Biol* 2007, **9**:144-150.
12. van Waarde A, Cobben DCP, Suurmeijer AJH, Maas B, Vaalburg W, de Vries EF, Jager PL, Hoekstra HJ, Elsinga PH: **Selectivity of ¹⁸F-FLT and ¹⁸F-FDG for differentiating tumor from inflammation in a rodent model.** *J Nucl Med* 2004, **45**:695-700.
13. Lee TS, Ahn SH, Moon BS, Chun KS, Kang JH, Cheon GJ, Choi CW, Lim SM: **Comparison of ¹⁸F-FDG, ¹⁸F-FET and ¹⁸F-FLT for differentiation between tumor and inflammation in rats.** *Nucl Med Biol* 2009, **36**:681-686.
14. Barthel H, Perumal M, Latigo J, He Q, Brady F, Luthra SK, Price PM, Aboagye EO: **The uptake of 3'-deoxy-3'-[¹⁸F]fluorothymidine into L5178Y tumours *in vivo* is dependent on thymidine kinase 1 protein levels.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005, **32**:257-263.
15. Solit DB, Santos E, Pratilas CA, Lobo J, Moroz M, Cai S, Blasberg R, Sebolt-Leopold J, Larson S, Rosen N: **3'-Deoxy-3'-[¹⁸F]fluorothymidine positron emission tomography is a sensitive method for imaging the response of BRAF-dependent tumors to MEK inhibition.** *Cancer Res* 2007, **67**(23):11463-11469.
16. Hatakeyama T, Kawai N, Nishiyama Y, Yamamoto Y, Sasakawa Y, Ichikawa T, Tamiya T: **¹¹C-methionine (Met) and ¹⁸F-fluorothymidine (FLT) PET in patients with newly diagnosed glioma.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008, **35**:2009-2017.
17. Sato N, Suzuki M, Kuwata N, Kuroda K, Wada T, Beppu T, Sera K, Sasaki T, Ogawa A: **Evaluation of the malignancy of glioma using ¹¹C-methionine positron emission tomography and proliferating cell nuclear antigen staining.** *Neurosurg Rev* 1999, **22**:210-214.
18. Leskinen-Kallio S, Nagren K, Lehikoinen P, Ruotsalainen U, Joensuu H: **Uptake of ¹¹C-methionine in breast cancer studied by PET. An association with the size of S-phase fraction.** *Br J Cancer* 1991, **64**:1121-1124.
19. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J: **qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data.** *Genome Biol* 2007, **8**:R19.
20. Brosseau JP, Lucier JF, Lapointe E, Durand M, Gendron D, Gervais-Bird J, Tremblay K, Perreault JP, Elela SA: **High-throughput quantification of splicing isoforms.** *RNA* 2010, **16**(2):442-449.
21. Euhus DM, Hudd C, LaRegina MC, Johnson FE: **Tumor measurement in the nude mouse.** *J Surg Oncol* 1986, **31**:229-234.
22. Hamacher K, Coenen HH, Stocklin G: **Efficient stereospecific synthesis of no-carrier added 2-[¹⁸F]-Fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution.** *J Nucl Med* 1986, **27**:235-238.

23. Pascali C, Bogni A, Iwata R, Decise D, Crippa F, Bombardieri E: **High-efficiency preparation of L-[S-methyl-¹¹C]methionine by on-column [¹¹C]methylation on C18 Sep-Pak.** *J Labelled Compd Rad* 1999, **42**:715-724.
24. Bergeron M, Cadorette J, Beaudoin JF, Lepage MD, Robert G, Selivanov V, Tetrault MA, Viscogliosi N, Norenberg JP, Fontaine R, Lecomte R: **Performance evaluation of the LabPET™ APD-based digital PET scanner.** *IEEE Trans Nucl Sci* 2009, **56**:10-16.
25. Selivanov V, Picard Y, Cadorette J, Rodrigue S, Lecomte R: **Detector response models for statistical iterative image reconstruction in high resolution PET.** *IEEE Trans Nucl Sci* 2000, **47**:1168-1175.
26. Fowler AM, Chan SR, Sharp TL, Fettig NM, Zhou D, Dence CS, Carlson KE, Jeyakumar M, Katzenellenbogen JA, Schreiber RB, Welch MJ: **Small-animal PET of steroid receptors predicts tumor response to endocrine therapy using a preclinical model of breast cancer.** *J Nucl Med* 2012, **53**:1119-1126.
27. Schiff R, Massarweh SA, Shou J, Bharwani L, Mohsin SK, Osborne CK: **Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**:331S-336S.
28. Sabnis G, Schayowitz A, Goloubeva OG, Macedo L, Brodie A: **Trastuzumab reverses letrozole resistance and amplifies the sensitivity of breast cancer cells to estrogen.** *Cancer Res* 2009, **69**(4):1416-1428.
29. Jelovac D, Sabnis G, Long BJ, Macedo L, Goloubeva OG, Brodie A: **Activation of mitogen-activated protein kinase in xenografts and cells during prolonged treatment with aromatase inhibitor letrozole.** *Cancer Res* 2005, **65**:5380-5389.
30. Dehdashti F, Flanagan FL, Mortimer JE, Katzenellenbogen JA, Welch MJ, Siegel BA: **Positron emission tomographic assessment of "metabolic flare" to predict response of metastatic breast cancer to antiestrogen therapy.** *Eur J Nucl Med* 1999, **26**(1):51-56.
31. Inoue T, Kim EE, Wong FCL, Yang DJ, Bassa P, Wong WH, Korkmaz M, Tansey W, Hicks K, Podoloff DA: **Comparison of fluorine-18-fluorodeoxyglucose and carbon-11-methionine PET in detection of malignant tumors.** *J Nucl Med* 1996, **37**:1472-1476.
32. Foster PA, Chander SK, Parsons MF, Newman SP, Woo LW, Potter BV, Reed MJ, Purohit A: **Efficacy of three potent steroid sulfatase inhibitors: preclinical investigations for their use in the treatment of hormone-dependent breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2008, **111**(1):129-138.
33. Van Themsche C, Parent S, Leblanc V, Descôteaux C, Simard AM, Bérubé G, Asselin E: **VP-128, a novel oestradiol-platinum(II) hybrid with selective anti-tumour activity towards hormone-dependent breast cancer cells *in vivo*.** *Endocr Relat Cancer* 2009, **16**:1185-1195.

4. Article 3

Évaluation du nouveau traceur des récepteurs 4-fluoro-11 β -méthoxy-16 α -[¹⁸F]-fluoroestradiol (4FMFES) par imagerie TEP d'un modèle murin de cancer du sein

Auteurs de l'article Michel Paquette, S. Phoenix, R. Langlois, É. Turcotte, J.E. van Lier, François Bénard, Roger Lecomte

Statut de l'article: Publié : Molecular Imaging and Biology (MIB), publié en ligne, avril 2013 (DOI: 10.1007/s11307-013-0638-7).

Avant-propos

Bien que ce manuscrit ait été revu et corrigé par l'ensemble des co-auteurs, le design expérimental, l'écriture du texte original, la conception des figures et le suivi des corrections tant des co-auteurs que des réviseurs a été fait entièrement par le premier auteur de cet article et auteur de la présente thèse (Michel Paquette). De plus, à l'exception de la synthèse des radiotraceurs FES et 4FMFES (l'équipe du cyclotron, dont R.Ouellet (FES), R.Langlois, et S Phénix (4FMFES)), et des qPCR (le centre de RNomique de l'Université de Sherbrooke), l'ensemble du travail expérimental a été effectué par ce même Michel Paquette, avec assistance technique mineure de la part du personnel du centre d'imagerie. Dr Bénard et Dr Lecomte ont quant à eux supervisé les travaux, ce dernier étant l'auteur de correspondance de cet article.

Résumé

Dans le but de comparer l'imagerie TEP au 4-fluoro-11 β -méthoxy-16 α -[¹⁸F]fluoroestradiol (4FMFES) avec celle au 16 α -[¹⁸F]fluoroestradiol (FES), ainsi que la captation *ex vivo* de ces 2 traceurs, un modèle murin porteur de tumeurs ER+ et ER α KD a été utilisé. Ainsi, les lignées MC7-L1 et MC4-L2 (ER+), et leurs équivalents réprimés pour ER α (ER α KD), ont été implantées dans des souris Balb/c en sous-cutané. 21 jours après l'implantation, l'imagerie TEP au FES ou au 4FMFES a été effectué sur les souris. Ainsi, des acquisitions TEP de 30 minutes débutant 1 heure post-injection ont été effectuées, et des valeurs de captation tumorale en %ID/g ont été obtenues. En parallèle, les données de biodistribution ont été obtenues 1 heure suite à l'injection de FES ou de 4FMFES. De plus, des échantillons de sang ont été pris à intervalles réguliers à des souris préalablement injectées avec une dose de FES ou de 4FMFES pour quantifier la présence de métabolites par chromatographie sur couche mince (TLC). Enfin, pour vérifier la spécificité du ciblage des récepteurs d'estrogène, un groupe de souris ne portant que des tumeurs ER+ ont été traitées avec l'inhibiteur compétitif d'ER fulvestrant 48 h avant l'imagerie au 4FMFES.

La stabilité métabolique des deux traceurs s'est avérée similaire chez la souris. Le FES et le 4FMFES ont réussi à distinguer les tumeurs ER+ des tumeurs ER α KD, autant par imagerie TEP que par les études *ex vivo*. L'imagerie au 4FMFES produit un meilleur %ID/g et un meilleur contraste que le FES dans les tumeurs ER+, alors que les études *ex vivo* montrent une captation plus élevée de 4FMFES dans toutes les lignées. Les souris traitées au fulvestrant ont présenté des tumeurs à faible captation de 4FMFES, ou indétectables.

En conclusion, le 4FMFES, un nouveau traceur TEP des récepteurs d'œstrogène, s'avère prometteur et obtient une meilleure captation et un meilleur contraste que le FES dans un modèle de souris porteuse de tumeurs.

Assessment of the Novel Estrogen Receptor PET Tracer 4-Fluoro-11 β -methoxy-16 α -[¹⁸F]fluoroestradiol (4FMFES) by PET Imaging in a Breast Cancer Murine Model

Michel Paquette¹, Serge Phoenix¹, René Ouellet¹, Réjean Langlois¹, Johan E. van Lier¹,
Éric E. Turcotte¹, Francois Bénard² and Roger Lecomte^{1*}

1. Sherbrooke Molecular Imaging Center, Department of Nuclear Medicine & Radiobiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

2. BC Cancer Agency Research Center, Department of Radiology, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada

Abbreviated Title: Murine PET imaging with new estrogen receptor tracer

Keywords: Receptor imaging; estrogen receptor α ; breast cancer; small animal PET.

* Corresponding author:

Roger Lecomte, PhD
Département de médecine nucléaire et radiobiologie
Sherbrooke Molecular Imaging Center
3001, 12th Avenue
Sherbrooke (Québec), Canada
J1H 5N4
Phone: 819-346-1110 # 11864
E-mail: Roger.Lecomte@USherbrooke.ca

ABSTRACT

Purpose: To compare the *in vivo* stability, uptake and PET imaging performance of a novel estrogen receptor PET tracer, 4-fluoro-11 β -methoxy-16 α -[¹⁸F]fluoroestradiol (4FMFES), with 16 α -[¹⁸F]fluoroestradiol (FES).

Procedures: MC7-L1 and MC4-L2 (ER+) cell lines, and their ER α -knockdown variants (ER α KD), were implanted subcutaneously in Balb/c mice. After 21 days, mice were imaged using either FES or 4FMFES. One hour post injection, static images were acquired for 30 minutes and the tumor %ID/g uptake values were derived. Biodistribution data were also obtained 1 hour following the injection of either FES or 4FMFES. Blood samples were taken at different times and analysed on thin-layer chromatography to quantify the presence of radiometabolites for each radiotracer. To assess specific targeting to the estrogen receptors, mice bearing only ER+ tumors were treated with the competitive ER inhibitor fulvestrant 48 hours prior to imaging with 4FMFES.

Results: Metabolic stability was found to be similar for both tracers in mice. Both FES and 4FMFES differentiated ER+ tumors from ER α KD tumors in biodistribution and PET imaging studies. 4FMFES achieved a significantly higher %ID/g uptake in ER+ tumors and MC4-L2 ER α KD tumors than FES in the PET imaging studies. Also, tumor-to-background ratio was higher in ER+ tumors using 4FMFES compared to FES. Dissection data showed a significantly higher %ID/g in all tested cell lines and ER-rich tissues using 4FMFES versus FES. Fulvestrant-treated mice had either low or undetectable tumor uptake.

Conclusion: In a tumor-bearing mouse model, 4FMFES achieves better specific tumor uptake and better contrast than FES, making it a promising candidate for ER imaging.

INTRODUCTION

16α - ^{18}F fluoroestradiol (FES) was successfully used in combination with positron emission tomography (PET) imaging to detect estrogen receptor positive (ER+) breast cancers in the pre-clinical [1] and clinical [2-5] settings. FES uptake correlated well with ER status [4] and ER expression analysed by IHC index [6]. Recently, FES PET imaging was used in a clinical study to follow ER modulation of metastatic breast cancers under different hormone therapies [7]. Furthermore, functional imaging of ER+ endometrial cancers was demonstrated using FES [8] and, in combination with FDG, it was possible to assess the aggressiveness of endometrial carcinomas [9]. However, FES is rapidly metabolized (mainly in the liver) by formation of glucuronate and sulfate conjugates [10], which results in an increase of unbound low-affinity radiometabolites in the blood and ultimately in a high image background, reducing the tumor contrast and the overall image quality.

In order to improve metabolic stability and overall performance of FES for estrogen receptor imaging, various derivatives have been advanced over the past decades [11]. In particular the 11β -methoxy and 11β -ethyl derivatives of FES showed pronounced effects on ER binding affinity and ER-mediated uterus uptake in immature rats [12]. Even though the addition of the 11β -methoxy group led to a 4-fold reduction in the relative binding affinity (RBA) for the ER while 11β -ethyl induced a dramatic increase in the RBA, *in vivo* selectivity was the highest for the 11β -methoxy-FES. We previously showed that simultaneous addition of 4-fluoro and 11β -methoxy substituents to either 16α - ^{125}I iodoestradiol [13] or $(17\alpha,20\text{Z})$ - ^{125}I iodovinylestradiol [14] further improved selectivity in an immature rat uterus model. The same modifications were subsequently evaluated for FES [15], revealing that a combination of 4-fluoro and 11β -methoxy substitution (4FMFES) gave, albeit reducing ER binding four-fold vs. FES, the highest *in vivo* specificity [16]. Biodistribution in a breast tumor-bearing Balb/c mouse model also gave better tumor-to-nonspecific tissue uptake [17], which led us to propose 4FMFES for further animal imaging studies as well as a phase I clinical trial. Encouraging 4FMFES-PET images in healthy women showed a significant uterine uptake and

retention, with a rapid blood clearance and similar biodistribution as compared to FES [18]. A stage II clinical trial comparing FES and 4FMFES in breast cancer patients has recently been initiated in our center and preliminary results are promising [19,20].

In this work, a tumor-bearing mouse model was used in conjunction with small animal PET to evaluate the potential of 4FMFES for functional imaging of breast tumors. MC7-L1 and MC4-L2 ER⁺ murine breast cancer cell lines, along with their ER α -knockdown (ER α KD) shRNA-carrying versions [21], were used here for assessing 4FMFES ER quantification performance in biodistribution uptake studies and *in vivo* imaging trials. The experiments were conducted in parallel with FES as a reference, to compare tumor contrast and to evaluate the achievable detection threshold with each tracer. Finally, in order to assess ER target specificity of 4FMFES, mice bearing MC7-L1 and MC4-L2 ER⁺ tumors were treated before imaging with fulvestrant, a potent ER antagonist and down-regulator.

Materials and Methods

Radiochemistry

Fluorine-18 was prepared by the $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ reaction on ^{18}O -enriched water as target material using a TR-19 cyclotron (ACSI, Vancouver, Canada). The methods used in the synthesis of FES have been previously reported [22]. The precursor for 4FMFES was synthesized as previously described [15] while labeling at the 16 α -position was accomplished via nucleophilic substitution with [^{18}F]F⁻ on the reactive 16 β , 17 β -cyclic sulfate intermediate [16] using an optimized automated procedure [23]. The preparation, formulation and quality control procedures of the 4FMFES batches were described elsewhere [18]. Specific activities of both tracers were similar or higher to those previously obtained [17, 18], that is 93.9 GBq/ μmol for FES, and 173.7 GBq/ μmol for 4FMFES.

Cell lines

MC7-L1 and MC4-L2 murine ER⁺ breast ductal carcinoma were described and characterized in previous works [24,25]. Creation of MC7-L1 and MC4-L2 ER α KD cells using lentiviral vectors carrying shRNA targeting specifically the ER α mRNA, and further characterization of these cell lines (estradiol binding properties, ER α content, etc.) were described elsewhere [21]. ER α KD cell lines have \approx 60% less ER α than their parental cell lines, and they all have very similar *in vivo* and *in vitro* growth properties and morphology. They were recently shown to provide a promising model to investigate ER-specific therapies using PET imaging [26]. Cell cultures were maintained as previously described [21] using DMEM media containing 10% FBS (Wisent St-Bruno, Canada), Antibiotic-Antimycotic Solution (Wisent, St-Bruno, Canada) and 10 nM medroxyprogesterone acetate (MPA; Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri).

Animals

The animal experiments were conducted according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and of the in-house Ethics Committee for Animal Experiments. MC7-L1, MC7-L1 ER α KD, MC4-L2 and MC4-L2 ER α KD were inoculated subcutaneously (1×10^7 cells) in the axillary area and in the middle of the back of Balb/c mice (Charles River, Montreal, Canada), each mouse carrying 4 tumors, one for each cell type. Implantation of the tumors was done under anaesthesia (13 mg/ml Ketamine, 86 mg/ml Xylazine; 1 ml/kg, i.p.). Tumors were grown up to \approx 4 mm in diameter prior to experiments.

***In vivo* metabolic stability of FES and 4FMFES**

Blood samples (25 μ L) were taken in heparin-coated tubes at 1, 5, 10, 20, 30 and 60 minutes after injection of either 3 MBq FES (n = 5) or 3 MBq 4FMFES (n = 4) in Balb/c mice. Plasma was removed from each sample and proteins were precipitated by addition of 5 volumes of 99% methanol and centrifugation at 13 krpm. Supernatants (25 μ L) and 10 μ L of an appropriate dilution of FES or

4FMFES were applied on a C-18 reversed-phase thin-layer chromatography (TLC) plate (Whatman, GE Healthcare), then eluted for 1 hour in a 85:14.6:0.4 mixture of methanol:water:glacial acetic acid. Radioactive compounds on the TLC plate were revealed using an Electronic Autoradiography Instant Imager (Canberra Packard, UK). Using the Imager software (Canberra Packard, UK), ROIs of the band corresponding to the intact radiotracer and of each entire lane were drawn. Ratios between the counts of the FES or 4FMFES bands in each lane and of the counts in the entire lane were calculated, and expressed as a percentage of the total activity in the form of the intact radiotracer.

Biodistribution

At 1 hour post injection of either 1.5 MBq FES or 1.5 MBq 4FMFES, tumor-bearing mice (n = 4 in each group) were euthanized under deep isoflurane anaesthesia (2.5% at 2 l/min oxygen flow) by CO₂ inhalation. Tissues of interest were removed, rinsed in saline, blotted dry and placed in pre-weighted tubes, all within 15 minutes. Radioactivity was counted in a Packard Cobra II Auto-Gamma Counter, corrected for decay and expressed as %ID/g.

PET Imaging

PET imaging studies were performed using two small animal PET scanners having similar hardware and performance, but having an axial field-of-view of 3.75 cm (LabPET4) or 7.5 cm (LabPET8). The latter was combined with a micro-CT scanner within the Triumph™ platform (Gamma Medica Inc.) [27,28]. Mice were placed on the scanner bed in prone position, under isoflurane anaesthesia (1% at 2 l/min oxygen flow). A pilot dynamic study on small groups of tumor-bearing mice confirmed the optimal scanning protocol for both 4FMFES and FES. No major differences in terms of tumor contrast and uptake could be observed for scans taken between 30 and 120 minutes post-injection. As such, imaging was initiated 1 hour after the i.v. injection (*via* the caudal vein) of either 4.5 MBq FES, or 10.5 MBq 4FMFES. Doses were determined based on the specific activity of each tracer to avoid mass effect that could impede tumor uptake [17]. PET data were acquired for

30 minutes with the tumors near the center of the field-of-view, in double axial sampling mode to improve spatial resolution.

The images were reconstructed using 20 iterations of an MLEM algorithm implementing a physical description of the detectors in the system matrix [29]. Quantification of the tumor uptake was performed using the in-house LabTEP image analysis software. The FES and 4FMFES signals were estimated by searching the highest 2×2 cluster of voxels (4Max) within the tumor region-of-interest (ROI). The background from circulating radiotracer and non-specific tissue uptake was estimated from a reference ROI placed on muscular tissues. This average background count rate was subtracted from the tumor peak count rate to obtain the net tumor uptake. After each scan sequence, a cylindrical phantom the approximate size of a mouse (24.8 ml) containing a known quantity of ^{18}F (≈ 5 MBq FES or 4FMFES) was used to obtain a calibration factor to convert the counts per seconds into kBq/ml, from which the injected dose per gram of tissue (%ID/g) values were derived. A density of 1 g/cc was used to convert the fractional uptake per volume into %ID/g. Contrast, evaluated as target-to-background ratio (T/B), was obtained by dividing the 4Max within the tumor ROI with the average background count rate. The AMIDE software was used to generate 3D whole-body maximum intensity projection (MIP) of the distribution of each tracer.

4FMFES PET imaging of fulvestrant-treated mice

Specific uptake inhibition in tumors was already demonstrated for FES in biodistribution experiments [17] and *in vivo* imaging studies using estradiol as a competitor [1]. As well, specific displacement of 4FMFES was observed in breast tumor-bearing mice by biodistribution studies [17], but never corroborated by PET imaging. Therefore, another group of mice ($n = 4$) bearing 2 MC7-L1 and 2 MC4-L2 tumors (ER+) received a 0.5 mg subcutaneous dose of fulvestrant 48 hours prior to PET imaging to confirm specific ER targeting of 4FMFES. The imaging protocol was identical to what was described above.

Statistical analysis

The data obtained from the net tumor uptake of ER+ tumors were compared to those of ERαKD tumors for each radiotracer. A repeated measure one-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test was used to check if the differences between groups of interest were statistically significant, with a probability threshold of 0.05. Furthermore, mean net uptake in each type of tumors for 4FMFES were compared to the corresponding uptake using FES, using a probability threshold of 0.05 (one-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test). The same statistical measurements were repeated for contrast measurements and biodistribution studies. Finally, comparisons between imaging data and biodistribution data were performed using a one-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test (probability threshold of 0.05). All other comparisons were carried out using a non-paired Student *t* test.

Results

***In vivo* stability of FES and 4FMFES**

The ratio between intact radiotracer and total activity in each blood sample as assessed by reversed-phase TLC was measured to obtain the percentage of non-metabolized FES or 4FMFES remaining at each observed time point (Figure 1a). Autoradiograms showed 4 distinct metabolite bands for FES between 1 and 10 minutes; only 2 metabolites remained 60 minutes after injection (Figure 1b). For 4FMFES, 2 metabolite bands were visible at all time points (Figure 1c). Both radiotracers were rapidly metabolized (less than 20% of intact radiotracer after only 5 minutes post-injection), and only ≈10% of non-metabolized radiotracer remained 60 minutes post injection.

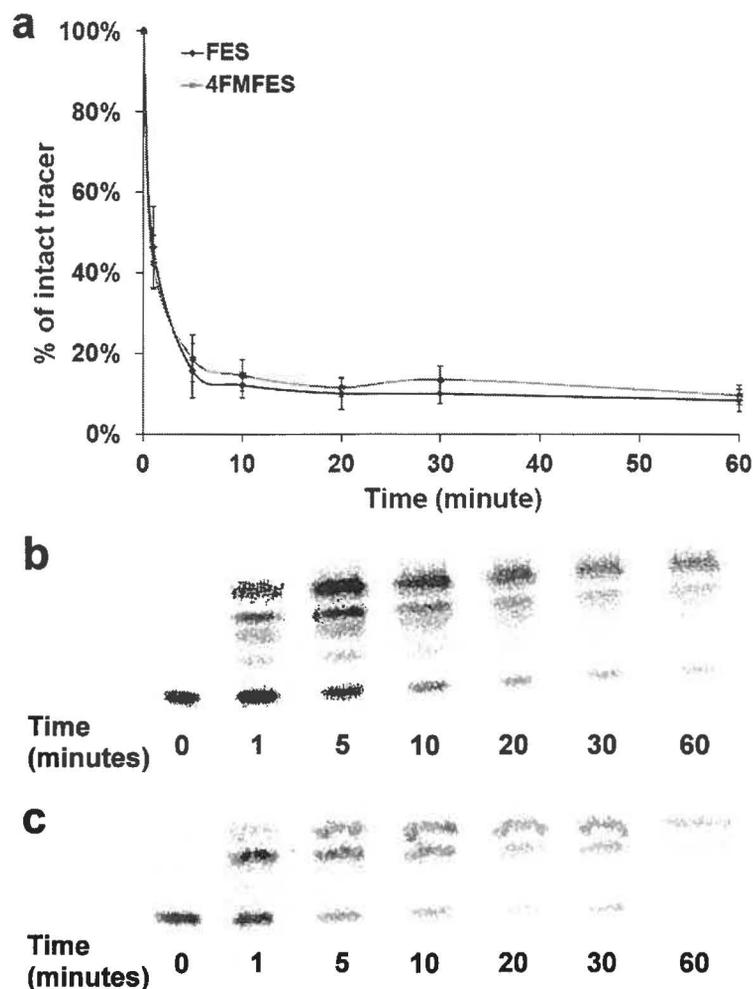


Fig.1. a) Average % of intact tracer remaining in the blood stream as assessed by reverse-phase thin-layer chromatography (TLC) analysis at each time point. FES: n = 5; 4FMFES: n = 4. b) Autoradiography of a reverse-phase TLC containing FES (time 0) and methanol-precipitated plasma samples taken at 1, 5, 10, 20, 30 and 60 minutes after injection of 1.5 MBq FES. c) Autoradiography of a reverse-phase TLC containing 4FMFES (time 0) and methanol-precipitated plasma samples taken at 1, 5, 10, 20, 30 and 60 minutes after injection of 1.5 MBq 4FMFES.

Biodistribution data

The radiotracer biodistribution was measured in different organs and the tumors 1 hour after injection of either 1.5 MBq FES or 1.5 MBq 4FMFES. The %ID/g was calculated for each tissue sample (Figure 2a). Uptake of ER⁺ tumors following FES injection was higher than for ER α KD tumors ($p < 0.05$); the same was observed using 4FMFES ($p < 0.01$). 4FMFES uptake (n = 6) was significantly higher than FES uptake (n = 6) for all four types of tumors. FES and 4FMFES

tumor uptakes, as assessed by PET imaging, were not significantly different from biodistribution uptake data ($p > 0.10$).

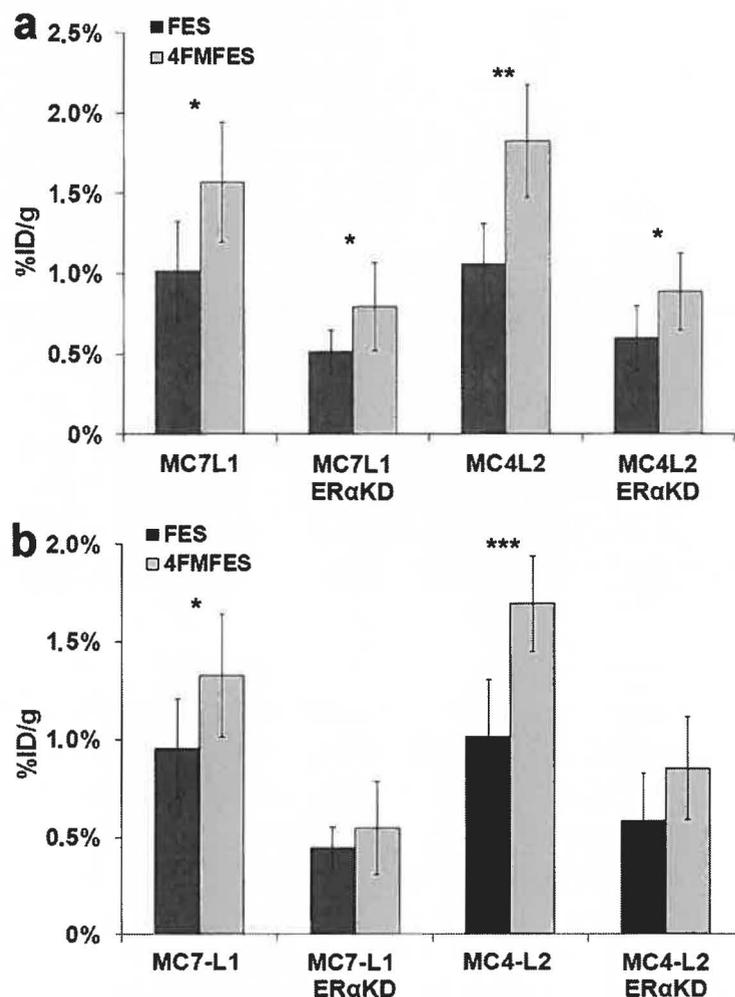


Fig. 2. Tumor uptake (expressed in %ID/g) of MC7-L1 and MC4-L2 (ER+ and ER α KD) **a** according to biodistribution data for FES (n=6) and 4FMFES (n=6) and **b** as determined by PET imaging for FES (n=9) and 4FMFES (n=8). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$.

FES uterine and ovarian uptakes were $4.35\% \pm 0.32\%$ and $6.4\% \pm 2.0\%$, respectively. In comparison, 4FMFES uptake was $12.2\% \pm 1.5\%$ for the uterus, and $13.7\% \pm 5.2\%$ for the ovaries. 4FMFES uptake for these tissues was significantly higher than FES uptake ($p < 0.005$ for uterus, and $p < 0.01$ for ovaries). FES and 4FMFES uptakes in other non-specific organs and tissues were consistent with known data [13].

FES and 4FMFES PET imaging

Two groups of tumor-bearing mice were imaged using either FES (n = 9) or 4FMFES (n = 8) using an identical imaging protocol. Uptake of both tracers was observed in ER⁺ tumors, and to a significantly less extent in ER α KD tumors. A very strong signal was also observed in the liver and the intestines due to hepatic metabolism and biliary excretion of steroids, in a pattern and intensity that were very similar for each tracer. Qualitatively, 4FMFES images presented more discernible tumors, and better overall image quality than FES images (Figures 3 and 4).

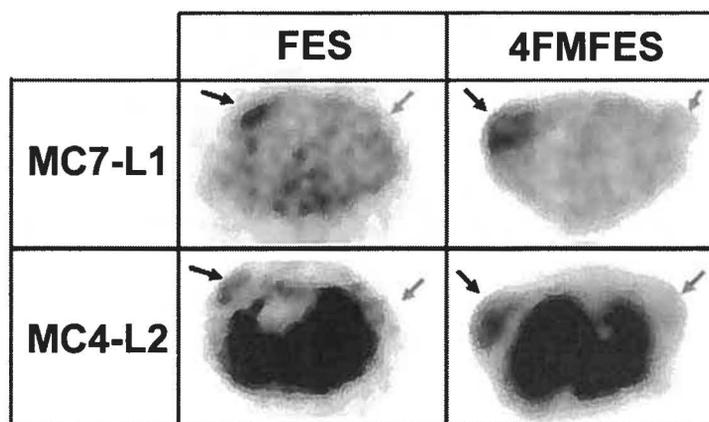


Fig. 3. Representative transaxial slices of MC7-L1 and MC4-L2 tumors, either ER⁺ (black arrow) or ER α KD (gray arrow), using either FES or 4FMFES for PET imaging.

The FES and 4FMFES tumor uptakes were evaluated semi-quantitatively from the PET images. Tumor ROIs were quantified and %ID/g values were calculated for each tumor (Figure 2b). As previously reported, FES uptake was significantly different between ER⁺ and ER α KD tumors ($p < 0.05$), but 4FMFES succeeded to distinguish between ER⁺ and ER α KD tumors with even higher significance ($p < 0.001$). 4FMFES uptake was higher than FES uptake for MC7-L1 ER⁺ ($p < 0.05$) and MC4-L2 ER⁺ ($p < 0.005$), but no significant differences were observed for ER α KD tumors.

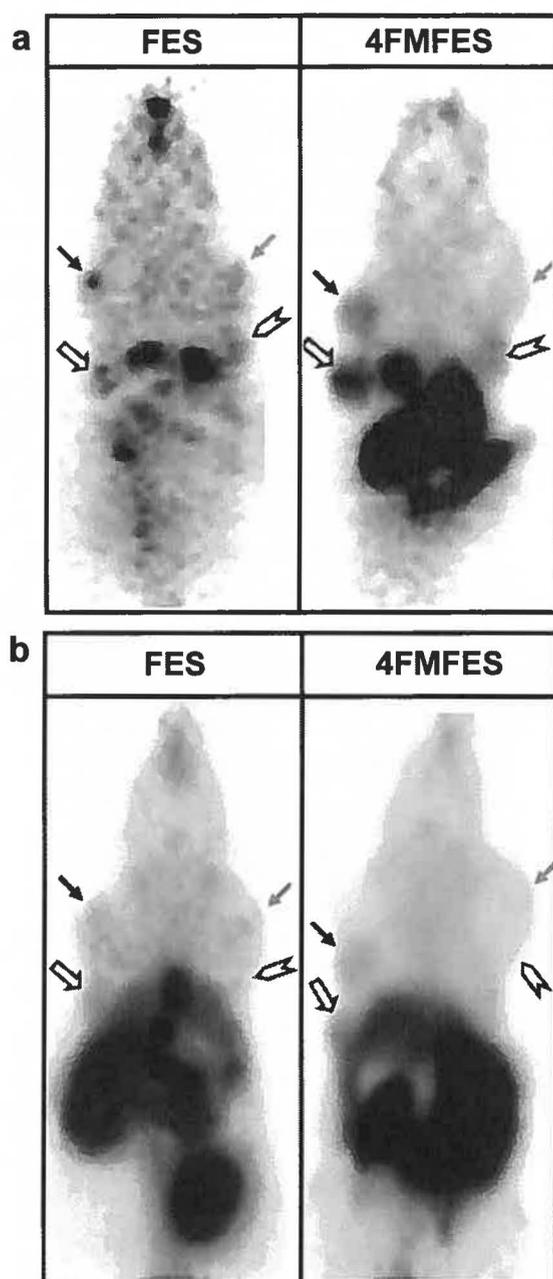


Fig. 4. PET imaging of MC7-L1 (ER+: black arrow; ER α KD: gray arrow) and MC4-L2 tumors (ER+: empty arrow; ER α KD: arrowhead) using either FES or 4FMFES, shown as **a** a representative coronal slice centered on the tumors and **b** a 3D maximum intensity projection image.

FES and 4FMFES contrast by PET imaging

In order to evaluate the tumor detection sensitivity of FES and 4FMFES, T/B was calculated for each tumor type (Figure 5). As expected, ER+ tumors reached a higher T/B than ER α KD tumors, regardless of the tracer used ($p < 0.001$ for MC7-

L1 tumors; $p < 0.05$ for MC4-L2 tumors). 4FMFES PET imaging achieved a higher T/B than FES for MC7-L1 ER⁺ tumors ($p < 0.05$) and MC4-L2 ER⁺ tumors ($p < 0.005$), but not for ER α KD tumors ($p > 0.19$).

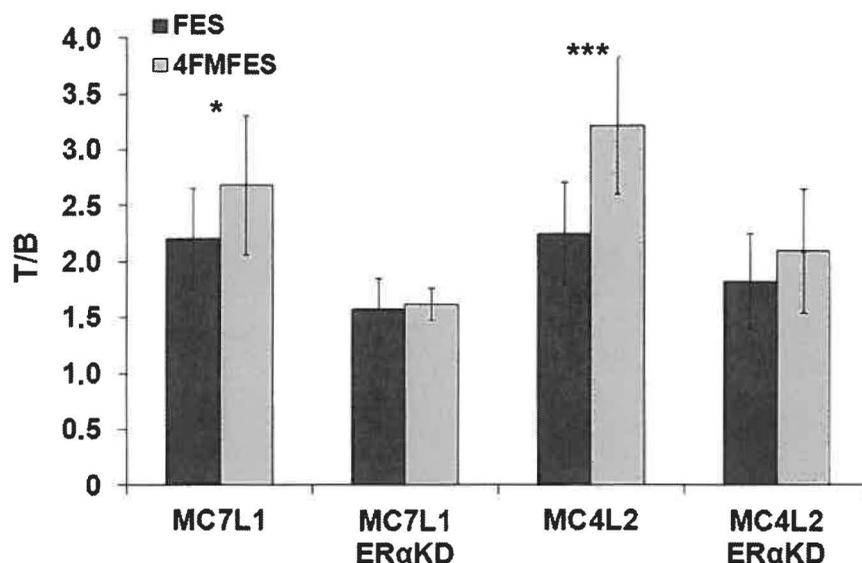


Fig. 5. Tumor-to-background (T/B) ratio of MC7-L1 and MC4-L2 (ER⁺ and ER α KD), using either FES or 4FMFES PET imaging. * $p < 0.05$; *** $p < 0.005$.

4FMFES PET imaging of fulvestrant-treated ER⁺ tumor-bearing mice

ER⁺ tumor-bearing mice pre-treated with fulvestrant were imaged to assess competitive inhibition of 4FMFES tumor uptake and hence specificity of this tracer to estrogen receptors. Among the 16 ER⁺ tumors imaged, only 6 (3 MC7-L1 and 3 MC4-L2) were detected and analysable. Quantitative measurements on the visible tumors showed a significantly reduced uptake ($p < 0.05$), with a %ID/g of $0.68\% \pm 0.40\%$ for MC7-L1 tumors and of $0.69\% \pm 0.32\%$ for MC4-L2 tumors, as compared to $>1.5\%$ ID/g without competition.

Discussion

FES is the most widely used and well-known estrogenic PET tracer. However, FES PET imaging has some drawbacks, including rapid metabolism and relatively low optimal contrast and uptake. Although the requirements for suitable

ER ligands has been well defined [11] and many attempts have been made to improve estrogen receptor imaging by creating new PET tracers, success has been limited [12;30-31]. In this context, the quest for a new tracer with better characteristics for receptor imaging than FES remains a relevant goal.

Among a series of 2-fluoro, 4-fluoro and 11 β -methoxy derivatives of FES, the 4FMFES showed the most promising *in vivo* ER-imaging properties in the female rat-uterus model, even though this derivative exhibits a 4- to 5-fold weaker *in vitro* RBA for the ER as compared to FES [16]. The latter study also revealed that 4FMFES, like the 11 β -methoxy-FES [12], showed very little affinity for non-specific albumin (AFP) and completely lost affinity for sex-hormone-binding globulin (SHBG), a steroid transport protein that is absent in mice, and whose role in human target-tissue localization remains elusive. *In vivo* uptake selectivity (target-to-nontarget ratio) has previously been correlated to binding selectivity indices (BSI) [12]. The BSI were calculated by dividing the RBA for ER by nonspecific binding (NSB) values derived from partition coefficients and chromatographic mobilities on reversed-phase columns. However, this correlation did not hold for the 11 β -substituted FES derivatives [12]. Chromatographic retention times on silica gel suggest that 4-fluoro addition onto FES has little effect on lipophilicity of either FES or 11 β -methoxy-FES, while 11 β -methoxy addition onto FES increases lipophilicity significantly, which correlates to the increase in target tissue specificity [16]. Thus the 11 β -methoxy substituent appears to be responsible for the increased *in vivo* specificity, while the contribution of the 4-fluoro likely centers on protecting 4FMFES against A-ring metabolism, resulting in increased *in vivo* stability. Overall the relative low ER binding affinity of 4FMFES appears to be more than compensated by its low affinity for nonspecific plasma proteins and increased metabolic stability, which may account for its improved *in vivo* tissue-specificity as compared to FES [17].

The design of 4FMFES evolved from previous works where 11 β -methoxy, 7 α -methyl and 2- or 4-fluoride were added alone or in combination to the estradiol

skeleton, together with the insertion of a radiohalogen as 17α -[^{125}I]iodovinyl [14], 16α -[^{125}I]iodo [13] and 16α -[^{18}F]fluoro [16]. First, 11β -methoxy substitution was reported to increase the target/non-target uptake ratio [12], as well as reducing binding with plasma proteins, notably SHBG [16,32]. Since rodents do not produce SHBG, this tumor-bearing mouse model removes this variable when comparing uptake and T/B ratio of both tracers, although other plasma globulins such as albumin and AFP could also play a role. Therefore, these interspecies differences in blood globulin content could lead to erroneous predictions of the imaging potential in humans and should be taken into account when translating animal data to clinical imaging. However, preliminary trials in human ER+ breast cancer imaging indicate no such failure for 4FMFES in spite of affinity loss for SHBG [20].

Second, both 3- and 17β -hydroxy groups of estradiol are susceptible of being substituted by a glucuronide or sulfate moieties through hepatic metabolism, increasing the polarity and reducing the receptor affinity of the molecule [10], although 2-hydroxylation and/or 3-glucuronidation were described as major metabolites in rats [33]. In order to prevent or reduce such metabolism, a series of 2- and 4-fluoro derivatives of FES were synthesized and evaluated [15-16]. The metabolic protection provided by the 4-fluoro substituent in the 4FMFES likely explains the increased imaging T/B ratio as compared to FES. However, even if preliminary data obtained from blood samples of 11 patients imaged with both FES and 4FMFES indicate that 4FMFES is 2.5-fold more stable to metabolism than FES in humans [34], the same could not be observed in mice. Indeed, both tracers are rapidly metabolized in mice, and the intact radiotracer (either FES or 4FMFES) represents only 10% of the blood radioactivity 60 minutes after injection, as assessed by radio-TLC of methanol-precipitated plasma samples (Figure 1). Since blood uptake was described as being lower for 4FMFES than for FES 60 minutes after injection in mice [17] and rats [16], the better uptake and contrast obtained by imaging with 4FMFES compared to FES in the tumor-bearing mice model could be explained by lower circulating levels of the radiotracer and its metabolites.

4FMFES whole body distribution in PET images was, as expected, very similar to that of FES and in agreement with previously reported biodistribution data [17]. Both tracers being steroids, the very high hepatic and intestinal uptake in images is not surprising, given that the normal elimination pathways for steroids are through liver metabolism and biliary excretion. Since primary breast lesions and its most frequent metastatic sites are localized in the thoracic area, it is expected that 4FMFES body distribution should not be an issue for breast cancer detection in most clinical cases, similar to what was already observed using FES PET [2-3].

Biodistribution data showed that 4FMFES yielded higher uterine and ovarian uptake than FES. High abdominal background prevented such measurements using PET imaging. While higher 4FMFES uptake was also observed in ER+ tumors, the difference in uptake between FES and 4FMFES in the uterus and ovaries is greater than in the tumors. This could be explained by the fact that those organs have higher ER concentration than the ER+ tumors used in this study, as well as a better perfusion. Hence, the relatively small gain in uptake for tumors using 4FMFES would be magnified in ER-rich and well-perfused tissues such as uterus and ovaries.

Given the lower average specific activity of FES syntheses compared to those of 4FMFES, the doses used for FES PET imaging were accordingly set lower than for 4FMFES imaging to avoid saturation of the receptors by the carrier. This could, at first sight, influence uptake and contrast values preferentially for 4FMFES, and explain at least partially why 4FMFES achieved better imaging performance for ER+ tumors. However, biodistribution experiments were carried out with the same doses for both tracers and yielded very similar results as PET imaging. Moreover, a recent clinical study demonstrated that higher specific activities and doses did not influence FES tumor uptake significantly [35]. We therefore conclude that the better PET imaging data cannot alone be explained by

the higher 4FMFES doses, but results from the superior intrinsic characteristics of 4FMFES for ER imaging.

In the mouse model, 4FMFES is metabolized at the same rate as FES, leaving an equivalent fraction of the intact tracer in the blood (Fig. 1a). Still, tumor uptake and contrast are improved with 4FMFES, likely as a result of a 1.7-fold reduced blood pool activity [17]. In humans, according to preliminary data, 4FMFES is 2.5-fold less metabolized than FES, and blood pool activity is reduced 5-to-6-fold compared to FES. So, even if interspecies differences exist, prospects bode towards improving contrast and image quality with 4FMFES in humans, as compared to FES.

As expected, both tracers reached a higher uptake and T/B ratio in ER⁺ than in ER α KD tumors. It was already known that ER⁺ tumors can be differentiated from ER α KD tumors by measuring FES specific uptake [17]. However, 4FMFES gave a higher uptake difference between ER⁺ and ER α KD tumors than FES, suggesting that 4FMFES achieves a better sensitivity than FES. Also, specificity of 4FMFES for ERs was tested using a competitive ER inhibitor, fulvestrant, in ER⁺ tumor-bearing mice. The majority of these tumors were not visible on the PET scans, and those that were quantifiable presented a substantially reduced uptake. The inhibition of 4FMFES uptake in ER⁺ tumors by fulvestrant, combined with the reduced uptake in ER α KD tumors, confirm that the 4FMFES tumor signal is ER-specific, in a similar manner as previously observed with FES.

Conclusion

Both FES and 4FMFES succeed to differentiate tumors having different levels of ER α expression in biodistribution and PET imaging studies. Also, both tracers have similar uptake, body distribution and elimination kinetics in the mouse model. 4FMFES achieves better PET imaging uptake and contrast in ER⁺ tumors than FES due to its higher ER-specific uptake and higher tumor-to-background ratio. Overall, according to the preclinical biodistribution and imaging data obtained

in this work, 4FMFES appears to be a promising alternative to FES with enhanced characteristics for estrogen receptor PET imaging.

Acknowledgments

We thank Jean-François Beaudoin, Jules Cadorette and Maxime Paillé for operating and maintaining the LabPET™ scanners. We also thank Mélanie Archambault, Véronique Dumulon-Perrault and Caroline Mathieu for technical assistance and animal care. This project was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grant #MOP-86717, and the Canadian Breast Cancer Research Alliance grant #015388.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare regarding this paper or the results therein.

References

1. Aliaga A, Rousseau JA, Ouellet R, et al. (2004) Breast cancer models to study the expression of estrogen receptors with small animal PET imaging. *Nucl Med Biol* 31:761-70.
2. Mintun MA, Welch MJ, Siegel BA, et al. (1988) Breast cancer: PET imaging of estrogen receptors. *Radiology* 169:45-48.
3. Dehdashti F, Mortimer JE, Siegel BA, et al. (1995) Positron tomographic assessment of estrogen receptors in breast cancer: comparison with FDG-PET and in vitro receptor assays. *J Nucl Med* 36(10):1766-1774.
4. Mortimer JE, Dehdashti F, Siegel BA, Katzenellenbogen JA, Fracasso P, Welch MJ (1996) Positron emission tomography with 2-[¹⁸F]Fluoro-2-deoxy-D-glucose and 16 α -[¹⁸F]Fluoro-17 β -estradiol in breast cancer: correlation with estrogen receptor status and response to systemic therapy. *Clin Can Res* 2:933-939.
5. Kumar P, Mercer J, Doerkson C, Tonkin K, McEwan AJ (2007) Clinical production, stability studies and PET imaging with 16-alpha-[¹⁸F]fluoroestradiol ([¹⁸F]FES) in ER positive breast cancer patients. *J Pharm Pharm Sci* 10(2): 256s-265s.
6. Peterson LM, Mankoff DA, Lawton T, et al. (2008) Quantitative imaging of estrogen receptor expression in breast cancer with PET and ¹⁸F-fluoroestradiol. *J Nucl Med* 49:367-74.
7. Linden HM, Kurland BF, Peterson LM, et al. (2011) Fluoroestradiol positron emission tomography reveals differences in pharmacodynamics of aromatase inhibitors, tamoxifen, and fulvestrant in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 17:4799-4805.
8. Tsujikawa T, Yoshida Y, Kiyono Y, et al. (2011) Functional oestrogen receptor α imaging in endometrial carcinoma using 16 α -[¹⁸F]fluoro-17 β -oestradiol PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 38:37-45.
9. Tsujikawa T, Yoshida Y, Kudo T, et al. (2009) Functional images reflect aggressiveness of endometrial carcinoma: estrogen receptor expression combined with ¹⁸F-FDG PET. *J Nucl Med* 50:1598-1604.
10. Mankoff DA, Tewson TJ, Eary JF (1997) Analysis of blood clearance and labeled metabolites for the estrogen receptor tracer [F-18]-fluorestradiol (FES). *Nucl Med Biol* 24:341-348.
11. Katzenellenbogen, JA (2011) The 2010 Philip S. Portoghese Medicinal Chemistry Lectureship: addressing the "core issue" in the design of estrogen receptor ligands. *J Med Chem* 54(15):5271-5282.
12. Pomper MG, VanBrocklin H, Thieme AM, et al. (1990) 11-beta-methoxy-, 11-beta-ethyl- and 17-alpha-ethynyl-substituted 16-alpha-fluoroestradiols: receptor-based imaging agents with enhanced uptake efficiency and selectivity. *J Med Chem* 33(12):3143-3155.

13. Ali H, Rousseau J, van Lier JE (1993) Synthesis of A-ring fluorinated derivatives of (17 α ,20E/Z)-[125I]iodovinylestradiols: effect on receptor binding and receptor-mediated target tissue uptake. *J Med Chem* 36:3061-3072.
14. Ali H, Rousseau J, Gantchev TG, van Lier JE (1993) 2- and 4-fluorinated 16 α -[125I]iodoestradiol derivatives: synthesis and effect on estrogen receptor binding and receptor-mediated target tissue uptake. *J Med Chem* 36:4255-4263.
15. Seimbille Y, Ali H, van Lier JE (2002) Synthesis of 2,16 α - and 4,16 α -difluoroestradiols and their 11 β -methoxy derivatives as potential estrogen receptor-binding radiopharmaceuticals. *J Chem Soc Perkin Trans 1* 5:657-663.
16. Seimbille Y, Rousseau J, Bénard F, et al. (2002) ¹⁸F-labeled difluoroestradiols: preparation and preclinical evaluation as estrogen receptor-binding radiopharmaceuticals. *Steroids* 67:765-775.
17. Bénard F, Ahmed N, Beauregard JM, et al. (2008) [¹⁸F]Fluorinated estradiol derivatives for oestrogen receptor imaging: impact of substituents, formulation and specific activity on the biodistribution in breast tumour-bearing mice. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35:1473-1479.
18. Beauregard JM, Croteau E, Ahmed N, van Lier JE, Benard F (2009) Assessment of human biodistribution and dosimetry of 4-fluoro-11 β -methoxy-16 α -¹⁸F-fluoroestradiol using serial whole-body PET/CT. *J Nucl Med* 50:100-107.
19. Paquette M, Lavallée É, Langlois R, et al. (2012) Preliminary results of a phase II trial comparing 4FMFES to FES in PET imaging of breast cancer patients [abstract]. *World Molecular Imaging Congress 2012, Dublin, Ireland*, P896.
20. Turcotte É, Paquette M, Lavallée É, et al. (2012) Comparison of 4FMFES-PET with FES-PET in a phase II trial to detect estrogen receptor-positive breast cancer: preliminary results [abstract]. *J Nucl Med* 53 (supplement 1):281.
21. Paquette M, Ouellet R, Archambault M, Croteau E, Lecomte R, Benard F (2012) [¹⁸F]-fluoroestradiol quantitative PET imaging to differentiate ER+ and ER α -knockdown breast tumors in mice. *Nucl Med Biol* 39:57-64.
22. Lim JL, Zheng L, Berridge MS, Tewson TJ (1996) The use of 3-methoxymethyl-16-beta, 17-beta-epiestriol-O-cyclic sulfone as the precursor in the synthesis of [¹⁸F]-16 α -fluoroestradiol. *Nucl Med Biol* 23:911-915.
23. Ahmed N, Langlois R, Rodrigue S, Benard F, van Lier JE (2007) Automated synthesis of 11 β -methoxy-4,16 α -[16 α -¹⁸F]difluoroestradiol (4F-M[¹⁸F]FES) for estrogen receptor imaging by positron emission tomography. *Nucl Med Biol* 34:459-464.
24. Lanari C, Lüthy I, Lamb CA, et al. (2001) Five novel hormone-responsive cell lines derived from murine mammary ductal carcinomas: *in vivo* and *in vitro* effects of estrogens and progestins. *Cancer Res* 61:293-302.
25. Fabris V, Lamb CA, Keck C, Aldaz MC, Merani S, Lanari C (2003) Karyotypic evolution of four novel mouse mammary carcinoma cell lines. Identification of marker chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 142:36-45.

26. Paquette M, Tremblay S, Bénard F, Lecomte R (2012) Quantitative hormone therapy follow-up in an ER+/ER α KD mouse tumor model using FDG and [^{11}C]-methionine PET imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imag Res* 2:61.
27. Bergeron M, Cadorette J, Beaudoin JF, et al. (2009) Performance evaluation of the LabPETTM APD-based digital PET scanner. *IEEE Trans Nucl Sci* 56:10-16.
28. Bergeron M, Cadorette J, Tétrault MA, et al. Imaging Performance of LabPET APD-based digital PET scanner for pre-clinical research. *Phys Med Biol* (submitted).
29. Selivanov V, Picard Y, Cadorette J, Rodrigue S, Lecomte R (2000) Detector response models for statistical iterative image reconstruction in high resolution PET. *IEEE Trans Nucl Sci* 47:1168-1175.
30. VanBrocklin HF, Carlson KE, Katzenellenbogen JA, Welch MJ (1993) 16 β -([^{18}F]Fluoro)estrogens: Systematic investigation of a new series of fluorine-18-labeled estrogens as potential imaging agents for estrogen-receptor-positive breast tumors. *J Med Chem* 36:1619-1629.
31. Seimbille Y, Bénard F, Rousseau J, et al. (2004) Impact on estrogen receptor binding and target tissue uptake of [^{18}F]fluorine substitution at the 16 α -position of fulvestrant (Faslodex;ICI 182,780). *Nucl Med Biol* 31:691-698.
32. Raynaud JP, Bouton MM, Gallet-Bourquin D, Philipbert D, Thournemine C, Azadian-Boulanger G (1973) Comparative study of estrogen action. *Mol Pharmacol* 9:520-533.
33. Stalford AC, Maggs JL, Gilchrist TL, Park BK (1997) The metabolism of 16-fluoroestradiols *in vivo*: Chemical strategies for restricting the oxidative biotransformations of an estrogen receptor imaging agent. *Steroids* 62:750-761.
34. Paquette M, Lavallée É, Langlois R, et al. (2012) 4FMFES and FES PET imaging from mice to human: different metabolism, different results [abstract]. *World Molecular Imaging Congress 2012, Dublin, Ireland*, P875.
35. Peterson LM, Kurland BF, Linka JM, et al. (2011) Factors influencing the uptake of ^{18}F -fluoroestradiol in patients with estrogen receptor positive breast cancer. *Nucl Med Biol* 38:969-978.

5. Discussion

5.1. Lignées cellulaires

L'établissement d'un modèle tumoral murin comparatif, où des tumeurs par ailleurs identiques possèdent différents niveaux d'expression d'ER α , se retrouvait à la base de tous les projets associés à cette thèse. Par conséquent, le choix des lignées tumorales et de la méthode de modulation d'ER α se sont avérés cruciaux pour la réalisation des différents projets.

D'abord, le choix des lignées murines ER+ MC7-L1 et MC4-L2 a été fait sur la base de deux propriétés à première vue paradoxales. En effet, *in vivo*, les tumeurs que ces lignées produisent sont sensibles à différents agents d'hormonothérapie, alors que contrairement à la majorité des lignées tumorales mammaires ER+, elles n'ont pas besoin de supplémentation en estradiol pour croître. Ainsi, les concentrations endogènes d'œstrogènes chez la souris Balb/c femelle de 18 à 25 grammes semblent être suffisantes pour le maintien et la croissance de ces tumeurs, alors que l'inhibition de la synthèse d'estrogènes (par le biais d'inhibiteurs d'aromatase), ou la liaison compétitive avec les ER (grâce à un antiœstrogène ou un SERM) affectent la progression tumorale chez la souris porteuse de tumeurs MC7-L1 et MC4-L2 (Aliaga *et al.*, 2004). Or, même si des niveaux endogènes (mais variables) d'œstrogène ne semblent pas influencer significativement la captation TEP du FES chez la femme (Peterson *et al.*, 2011), la supplémentation en estradiol des souris aurait pu interférer avec l'imagerie des ER. De plus, ces lignées croissent rapidement *in vitro* et *in vivo*, ce qui facilite la planification expérimentale et économise du temps. Sans compter que ces lignées sont syngéniques avec la souris Balb/c, ce qui nous évite de greffer les tumeurs dans des animaux immunosupprimés, créant un modèle plus réaliste (avec présence d'immunité). Pour toutes ces raisons, ces 2 lignées d'adénocarcinome

mammaire murin constituent un excellent modèle de départ pour une étude plus approfondie de l'imagerie des ER et du suivi de thérapies antihormonales.

Différentes stratégies peuvent être utilisées pour obtenir un modèle où des tumeurs ont des niveaux variables d'expression d'ER α . Une première approche consiste à utiliser 2 lignées tumorales différentes, l'une étant ER+ et l'autre ER α -. Par contre, il est plus que probable que les différences dans ce cas ne soient pas limitées à l'expression d'ER α , et s'étendent à des différences génotypiques (caryotype, patron d'expression globale des gènes, etc) et phénotypiques (taux de croissance, morphologie, etc) importantes. Ainsi, non seulement il y a un risque accru qu'un effet observé ne soit pas dû au facteur suivi (ici, ER α), mais en plus, les différences phénotypiques pourraient grandement compliquer le travail expérimental (par exemple, une tumeur ER+ ayant un taux de croissance *in vivo* beaucoup plus rapide que la tumeur ER α - à comparer). Deuxièmement, au lieu d'utiliser des lignées ER+ comme point de départ, il serait possible (et techniquement assez simple) d'introduire une cassette de surexpression d'ER α à une lignée ER-. Or, si un tel système permet l'obtention de 2 lignées (l'une ER+ et l'autre ER α -) possiblement semblables au niveau génotypique et phénotypique, le simple ajout d'ER α à une lignée ER-, bien qu'assurant l'expression de la protéine, n'est pas garant que les mécanismes de signalisation d'ER α soient fonctionnels. Un tel modèle aurait pu être utilisé pour la validation différentielle de traceurs TEP des ER, mais n'aurait pas nécessairement mené à des différences de réponse aux thérapies antihormonales, par exemple. Troisièmement, une autre avenue possible est de supprimer toutes les allèles ER α des lignées MC7-L1 et MC4-L2 (ou autres lignées appropriées), créant ainsi des lignées ER α - à partir de ces deux lignées ER+. Néanmoins, une telle procédure implique la suppression séquentielle d'au moins 2 allèles (dépendamment du caryotype) de ce gène, et constituerait ainsi une procédure plus lourde. De plus, bien que les souris mutantes de délétion pour ER α soient infertiles mais viables (Lubahn *et al.*, 1993), il est possible qu'une telle procédure sur les lignées tumorales puisse ne pas être viable, ou altérer significativement le comportement (génotype et phénotype) des tumeurs. Pour

l'ensemble de ces raisons, une quatrième voie a été choisie, soit l'utilisation de l'ARN interférence pour réprimer spécifiquement l'expression d'ER α . L'utilisation de siRNA transfecté aurait été intéressante et simple à utiliser, mais n'aurait donné qu'un effet transitoire. C'est pourquoi une approche donnant des résultats permanents a été choisie, c'est-à-dire l'inclusion dans le génome des lignées cellulaires d'intérêt d'une séquence de shRNA ciblant ER α par infection lentivirale. Les premiers essais effectués ont été de faire soi-même le désign et le clonage dans un vecteur lentiviral de 2 différentes séquences shRNA contre ER α . Or, bien que les règles de conception de base ont été suivies dans le choix des séquences d'analogie des shRNA avec ER α , le résultat final a été moindre qu'escompté. Au même moment, cette technologie est devenue disponible commercialement à moindre coût. Ainsi, le système de vecteurs lentiviraux porteurs de shRNA pLKO de la compagnie Sigma-Aldrich est apparu comme une alternative intéressante. Pour le gène ER α murin, une série de 5 différents shRNA a été testé dans les lignées MC7-L1 et MC4-L2. Bien que les résultats ont varié (tel qu'attendu) d'une séquence à l'autre, le shRNA #2 a été celui ayant le mieux réussi dans la lignée MC7-L1, alors que le shRNA #1 a produit la meilleure inhibition de l'expression d'ER α dans la lignée MC4-L2 (figure 6).

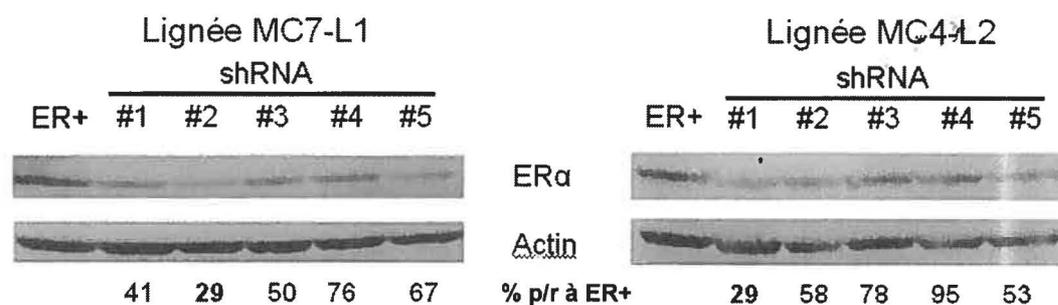


Figure 6 : Immunobuvardage contre ER α ou l'actin (contrôle) d'extraits de protéines des lignées MC7-L1 et MC4-L2, soit de type sauvage (ER+), ou infecté par un lentivirus portant différents shRNA (#1 à #5). Chaque bande d'ER α est quantifiée, normalisée pour l'intensité d'actin correspondante, puis comparé à ER+ (% p/r à ER+).

Ces deux lignées ont par la suite été appelées MC7-L1 ER α KD et MC4-L2 ER α KD, puis caractérisées plus en détails. Des courbes de dose-compétition et de saturation à [3 H]-estradiol ont permis de déterminer la baisse relative du B_{Max} entre

les lignées ER⁺ et ER α KD, et même d'en déduire la quantité de récepteurs (en femtomoles) par masse d'ADN ou de protéine, ou par 10⁵ cellules. Ainsi, une baisse d'environ 50% de la protéine ER α a pu être observée par ces méthodes, alors que l'immunobuvardage donne une diminution de l'ordre de 70-75% et que les qPCR montrent une réduction d'expression d'environ 60%. Ces différences peuvent s'expliquer par au moins deux façons. D'abord, l'immunobuvardage n'est que semi-quantitatif, car autant la liaison anticorps-antigène que la cinétique enzymatique de la peroxidase de raifort de l'anticorps secondaire responsable de l'apparition du signal (par création d'un produit à la fois chemoluminescent et fluorescent) ont une relation linéaire avec la quantité d'antigène à détecter que sur 1 à 2 ordres de magnitude. Pire, l'usage d'une autoradiographie pour révéler le signal chemoluminescent a également une relation linéaire d'une étendue limitée entre l'intensité du signal et la quantité d'antigène. On peut partiellement pallier ce dernier point par l'usage d'un imageur à fluorescence (comme c'est le cas dans les projets de cette thèse), dont la méthode de détection offre une plage dynamique élargie comparé aux films au nitrate d'argent, en plus d'être accompagné de logiciels spécialisés pour l'analyse des bandes.

Ensuite, d'autres analyses d'immunobuvardage et de qPCR ont détecté de faibles mais significatives quantités de la protéine ER β . Alors que les deux types d'ER attachent l'estradiol avec une affinité similaire (Tremblay *et al.*, 1997; Kuiper *et al.*, 1998), l'immunobuvardage contre ER α est spécifique; l'écart entre les méthodes immunologiques et pharmacologiques peut être partiellement dû à la contribution de la captation de [³H]-estradiol par ER β aux courbes de saturation et de compétition.

Suivant les tests biochimiques des nouvelles lignées ER α KD, des observations phénotypiques, ainsi qu'un patron d'expression génétique sommaire ont été effectués. D'abord, l'apparence et la taille des cellules des lignées ER α KD est de très similaire à identique à celles des lignées ER⁺ correspondantes. Bien

que le temps de dédoublement *in vitro* n'ait pas été calculé de manière précise, la culture d'une lignée ER⁺ et de sa version ER α KD atteignent la confluence en même temps, et les passages peuvent se faire aussi en même temps et aux mêmes dilutions de cellules par flacon. De plus, un flacon confluent contient le même nombre de cellules, que ce soit une culture ER⁺ ou ER α KD, tel que compté par hématocytomètre. De même, l'implantation de quantités identiques de cellules ER⁺ ou ER α KD à différents sites en sous-cutané chez la souris mène à une croissance tumorale *in vivo* équivalente. Toutes ces caractéristiques indiquent que la répression spécifique d'ER α n'a pas mené à des changements phénotypiques observables dans des conditions de croissance *in vivo* et *in vitro* normales. Ainsi, il est possible que la présence d'une quantité réduite, mais substantielle d'ER α , combiné à la présence résiduelle d'ER β , aient été suffisantes pour le maintien des voies de signalisation dépendantes des ER de manière à permettre une croissance (et un phénotype) normale. Néanmoins, parmi les quelques gènes d'intérêt dans le cancer du sein observés par analyse qPCR, soit PR, BRCA1 et ErbB2, la modulation d'ER α a entraîné des changements de patrons d'expression. Ainsi, le récepteur de la progestérone, dont la transcription dépend directement des ER activés par un agoniste, a une expression réduite dans les deux lignées ER α KD, comparativement aux lignées parentales. Pour ce qui est de BRCA1 et d'ErbB2, ces deux gènes sont surexprimés (de 1,5X et 2,5X, respectivement) dans la lignée MC7-L1 ER α KD par rapport à MC7-L1 ER⁺, tandis qu'aucune différence significative d'expression n'est observée entre la lignée MC4-L2 ER⁺ et sa forme ER α KD pour ces 2 gènes.

D'abord, pour les lignées MC7-L1 ER⁺ et ER α KD, la surexpression modérée du gène BRCA1 est difficile à expliquer. En effet, même si le blocage antisens (provoquant un effet semblable à l'ARN interférence) de BRCA1 provoque une surexpression d'ER α , rien n'indique qu'une inhibition d'ER α puisse provoquer une augmentation de l'expression de BRCA1 (Thasni *et al.*, 2008; Annab *et al.*, 2000). Pire, certains résultats démontrent qu'une stimulation à l'estradiol entraîne la surexpression de BRCA1 (Gudas *et al.*, 1995; Marquis *et al.*,

1995), ce qui est à première vue incompatible avec une baisse d'ER α provoquant une augmentation de BRCA1. Néanmoins, il ne faut pas confondre baisse d'expression d'ER α avec une baisse de fonction. Aussi, considérant le faible niveau de surexpression de BRCA1 (1,5 plus élevé), il n'est pas exclu que cette hausse soit due au hasard, ou à d'autres facteurs indépendants de la répression d'ER α . De plus, malgré que BRCA1 soit entre autres impliqué dans la réparation des dommages à l'ADN et le cycle cellulaire, il est peu probable qu'une hausse aussi modeste puisse mener à une résistance accrue à des agents génotoxiques ou aux radiations ionisantes, quoique cette avenue devrait être explorée plus en détails. Quant au gène ErbB2, sa surexpression de 250% dans la lignée MC7-L1 ER α KD par rapport aux cellules MC7-L1 peut s'expliquer par le fait que ce gène (ainsi que EGFR) interagit avec le signalé dépendant d'ER α (Schiff *et al.*, 2004), et peut ainsi agir comme mécanisme de compensation face à la perte d'ER α (Sabnis *et al.*, 2009). Ainsi, il n'est pas étonnant qu'une diminution d'expression d'ER α ait été accompagnée d'une hausse équivalente d'ErbB2.

Ensuite, les lignées MC4-L2 ER α KD ont aussi subi une baisse d'expression du récepteur de la progestérone par rapport à la lignée MC4-L2; cette baisse est même plus prononcée que celle observée pour la lignée MC7-L1 ER α KD. Par contre, l'absence de modulation des gènes BRCA1 et ErbB2 dans la lignée MC4-L2 ER α KD indique peut-être des différences dans les mécanismes et voies de signalisations entre les 2 différentes lignées ayant subi une répression d'ER α , et nécessiterait une analyse plus approfondie. Il est utile de rappeler que toutes les lignées étudiées ont des phénotypes très similaires dans des conditions normales de croissance *in vitro* et *in vivo*, malgré les différences dans le patron d'expression des gènes observés.

5.2. Imagerie TEP

5.2.1. Imagerie quantitative

Un des points communs de tous les protocoles d'imagerie TEP utilisés dans cette thèse (peu importe le traceur) est l'aspect quantitatif. Normalement, les appareils TEP sont étalonnés de manière à convertir directement les comptes détectés en becquerels/ml, permettant la quantification de la captation des tissus. Or, nos appareils n'étant pas suffisamment stables pour implémenter une telle procédure (principalement dû à un contrôle imparfait de la température de la pièce), une méthode alternative a dû être utilisée. Cette procédure implique d'imager une mire cylindrique approximant la taille d'une souris (24,8 ml) contenant une quantité connue de radioactivité (idéalement similaire aux doses injectées aux animaux étudiés), puis d'utiliser une région d'intérêt au centre de la mire pour convertir les comptes par seconde de chaque signal tumoral net en Becquerels (Bq), ou désintégrations par seconde. Par la suite, la dose injectée à l'animal étant connue, sachant qu'un voxel représente $0,29 \text{ mm}^3$, et estimant que la densité du tissu tumoral est de 1 g/ml, il est possible d'obtenir une valeur absolue de captation tumorale en dose injectée par gramme de tissu (%ID/g). Bien que cette méthode permette de quantifier la captation des tissus d'intérêt, elle comporte certaines lacunes. D'abord, malgré le faible gabarit des souris (et des mires) étudiées, l'atténuation et la diffusion des photons d'annihilation par les tissus sont des facteurs non totalement négligeables, et partiellement compensée par l'usage d'une mire de dimension semblable à une souris. Ainsi, il n'est pas exclu que certaines régions (surtout au centre) des animaux aient un signal sous-représentant la réalité. Idéalement, chaque animal et mire devrait subir une tomodensitométrie en parallèle à chaque image TEP pour cartographier les facteurs d'atténuation et de diffusion; l'importance de cette procédure s'accroît avec la taille de l'animal (rats, lapins) et la densité des tissus (crâne) étudiés.

Ensuite, la densité tissulaire, bien que s'approchant de celle de l'eau (1 g/ml), n'est pas identique et varie d'un tissu (et d'un type de tumeur) à l'autre. Bien

que les tumeurs MC7-L1 et MC4-L2 (et leurs équivalents ER α KD) aient été caractérisées sous plusieurs angles, la densité cellulaire *in vivo* n'a pas été mesurée. Ainsi, une légère imprécision a été introduite de cette façon dans nos mesures quantitatives.

De surcroît, une sous-représentation du signal de tissus de petites tailles (comme des greffes de tumeurs) peut se produire à cause de l'effet de volume partiel. Néanmoins, des données (non publiées) obtenues par le laboratoire sur les appareils TEP utilisés en imageant des cylindres et des sphères radioactives de différents diamètres ont permis d'évaluer la taille minimale d'un objet où l'effet de volume partiel devient négligeable. Au nombre d'itérations MLEM utilisées pour la reconstruction des images de souris porteuses de tumeurs (c'est-à-dire 20), cette limite correspond à des objets d'environ 3 mm de diamètre (sphère de 14,1 mm³). Puisque les tumeurs imagées étaient toujours au-dessus de ce seuil, l'effet de volume partiel a été considéré dans tous les cas comme étant négligeable, mais tout éventuel protocole visant à imager des objets plus petits (ou en utilisant des appareils TEP moins performants en terme de résolution spatiale) devra en tenir compte.

Enfin, la captation a été évaluée par estimation du % de dose injectée par gramme de tissu (%ID/g), alors que l'imagerie est aujourd'hui considérée par certains comme quantitative seulement lorsque découlant de l'analyse pharmacocinétique du traceur (courbe d'entrée sanguine, analyse compartimentale, etc). Ces facteurs expliquent pourquoi il est parfois mention d'imagerie semi-quantitative au lieu de quantitative dans les articles présentés ici.

5.2.2. Imagerie TEP des récepteurs d'oestrogène

L'imagerie TEP au FES a déjà été utilisée dans de nombreuses études pour détecter des tumeurs du sein ER+ en clinique (entre autres : McGuire *et al.*, 1991; Dehdashti *et al.*, 1995; Peterson *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2007). Une très forte corrélation entre la captation de FES (SUV) par des tumeurs mammaires avec

l'indice d'immunohistochimie anti-ER de biopsies de tumeurs correspondantes a été observée en clinique (Peterson *et al.*, 2008). Ainsi, le FES est un traceur relativement bien caractérisé, et utilisé dans plusieurs centres pour l'imagerie du cancer du sein (voir ci-haut) et de l'endomètre (Tsujikawa *et al.*, 2009; Tsujikawa *et al.*, 2011). Par contre, le FES ayant certaines caractéristiques indésirables (notamment son métabolisme rapide, générant des radiométabolites diminuant le contraste des images), d'autres agents ont été développés, dont le 4FMFES.

Ainsi, l'imagerie TEP au FES a pu servir en premier lieu à valider le modèle de souris porteuse de tumeurs ER+/ER α KD comme modèle d'imagerie des récepteurs d'œstrogène. D'abord, autant l'imagerie TEP au FES que les données *ex vivo* obtenues suivant une injection au FES ont montré une captation significativement plus basse (d'environ 50%) dans les tumeurs ER α KD que dans les tumeurs ER+. Cette différence observée en imagerie entre les tumeurs ER+ et ER α KD a pu être corrélée avec la réduction quantifiée d'ER par analyse des courbes de saturation et par qPCR des lignées correspondantes. De plus, aucune différence significative n'a été observée entre les captations tumorales mesurées en imagerie TEP et les données *ex vivo*, renforçant davantage la méthodologie d'analyse TEP. En parallèle, aucune différence significative de captation tumorale n'a été mesurée pour toutes ces tumeurs lorsque du FDG est utilisée pour l'imagerie TEP, montrant la spécificité de captation différentielle du FES. D'ailleurs, cette captation de FDG équivalente pour toutes les tumeurs indique qu'il n'y a pas de différence de métabolisme du glucose entre une tumeur ER+ et une tumeur ER α KD, et appuie les autres observations phénotypiques en conditions normales.

En deuxième lieu, le modèle ER+/ER α KD a donné l'occasion de valider le 4FMFES pour l'imagerie des récepteurs d'estrogène, et même de comparer ses performances avec le FES. Non seulement ce traceur est capable, tout comme le FES, de différencier une tumeur ER+ d'une tumeur ER α KD, mais en plus il obtient une captation et un contraste (signal sur le bruit de fond) tumoral significativement plus élevé que le FES pour l'imagerie de tumeurs ER+. Quant aux données de

biodistribution, elles indiquent une plus forte captation de 4FMFES que de FES, peu importe le type de tumeurs. Or, le suivi des métabolites plasmatiques du 4FMFES et du FES chez la souris ne montre aucune différence de métabolisme entre les deux traceurs. En effet, les courbes décrivant la proportion de traceur non métabolisé dans le temps se superposent pour le FES et le 4FMFES; dans les deux cas, seulement 10% de la radioactivité résiduelle provient du traceur intact 60 minutes suivant l'injection à des souris. Or, d'autres facteurs peuvent expliquer la plus forte captation tumorale et utérine du 4FMFES par rapport au FES, et ce malgré que le 4FMFES ait une affinité sélective moindre ($\approx 5\%$ plus faible; Seimbille *et al.*, 2002) que le FES pour les ER *in vitro*. D'abord, l'ajout d'un groupement 11β -méthoxy a déjà été rapporté comme améliorant la captation *in vivo* de plusieurs dérivés de l'estradiol (Pomper *et al.*, 1990; Ali *et al.*, 1991; Zielinski *et al.*, 1989). Ensuite, bien que le fluor en position 4 n'ait qu'un effet négligeable sur le coefficient de partition du 4FMFES, le groupement 11β -méthoxy du 4FMFES augmente la lipophilicité de ce traceur par rapport au FES. La lipophilicité d'un composé peut contribuer à augmenter la captation non-spécifique (Helmer *et al.*, 1968), mais elle permet aussi une meilleure pénétration des membranes cellulaires, une meilleure capacité à quitter le compartiment sanguin et donc un plus grand potentiel d'atteindre les tissus riches en ER par rapport aux tissus non-spécifiques, ce qui semble être le cas pour le 4FMFES.

Par ailleurs, bien que le FES s'attache à la SHBG (une globuline plasmatique liant les hormones) avec une affinité relative à l'estradiol de 4,5%, cette même affinité pour le 4FMFES est beaucoup plus faible, soit de 0,002% (Seimbille *et al.*, 2002). Le rôle de SHBG dans le transport et la captation des composés dérivés de l'estradiol est ambigu ; certaines observations indiquent que seules les hormones libres (donc pas liées à la SHBG) peuvent exercer leur action, tandis que d'autres études pointent vers un rôle de transport et de ciblage des œstrogènes par la SHBG. La SHBG étant absente chez la souris, cette variable est éliminée dans la présente étude, mais pourrait jouer un rôle chez l'humain. Enfin, le pourcentage de dose injectée par gramme de tissu (%ID/g) du sang 60

minutes après l'injection de 4FMFES à des souris est de 0,21%ID/g, alors qu'il est de 0,36%ID/g pour le FES (Bénard *et al*, 2008), indiquant une moindre présence de 4FMFES dans le compartiment sanguin que le FES. Cette clairance sanguine accrue semble être le facteur dominant expliquant la captation et le contraste tumoral amélioré de l'imagerie TEP au 4FMFES par rapport au FES chez la souris.

L'évaluation des traceurs par le contraste obtenu à la tumeur donne une indication plutôt qualitative de ceux-ci. En effet, le contraste étant simplement le ratio du signal spécifique sur le bruit de fond, il ne quantifie pas la capacité de chaque traceur à détecter une lésion donnée. Un tel seuil de détection peut être calculé en prenant le signal moyen de régions d'intérêt situées dans des tissus non-spécifiques, puis d'ajouter de trois à cinq écart-types (σ) à cette moyenne (Bao et Chatziioannou, 2010). Ensuite, ces résultats seront corrigés pour la dose injectée aux animaux, donnant ainsi un seuil de détection en Bq/ μ l par MBq injecté. Plus ce seuil est bas, plus les chances de détecter un tissu spécifique sont élevées. Ainsi, les tumeurs dont le signal dépasse ce seuil peuvent être considérées comme étant détectées avec certitude. Le seuil de détection moyen (à 3σ) calculé pour le 4FMFES dans notre modèle de souris pour le muscle est établi à 9,4Bq/ μ l par MBq injecté, tandis qu'il est à 10,9Bq/ μ l par MBq injecté à 5σ . Les tumeurs MC7-L1 dépassent en moyenne le seuil 3σ (avec $10,1\pm 3,7$ Bq/ μ l par MBq injecté), alors que les tumeurs MC4-L2 sont en moyenne au-dessus du seuil 5σ ($12,7\pm 3,6$ Bq/ μ l par MBq injecté). Les tumeurs ER α KD se retrouvent sous ce seuil de détection théorique. Pour le FES, malgré des seuils de détection similaires ($3\sigma = 9,8$ Bq/ μ l par MBq injecté, $5\sigma = 11,6$ Bq/ μ l par MBq injecté), aucun des types de tumeurs étudiées ne dépasse le seuil 3σ . Ainsi, en utilisant cet outil plus objectif, les mêmes conclusions peuvent être tirées que par analyse du contraste, c'est-à-dire que le 4FMFES est supérieur au FES pour l'imagerie TEP des ER dans un modèle animal. Néanmoins, ces résultats indiquent que chez la souris porteuse de tumeurs, le seuil minimal pour lequel un signal se distingue clairement du bruit de fond est semblable pour les deux traceurs, mais le 4FMFES est plus capté que le FES par les tumeurs ER+.

Dans la présente étude, pour les 2 traceurs (FES et 4FMFES), les 4 différentes tumeurs ont pu être étudiées sur le même animal. Ainsi, les tumeurs ER+ sont à gauche de l'animal en pronation, alors que les tumeurs ER α KD sont placées à la droite; les lignées MC7-L1 sont sur les épaules, alors que les lignées MC4-L2 sont situées au milieu du dos. Bien que ce modèle augmente la puissance des comparaisons statistiques subséquentes, simplifie l'analyse et réduit les risques d'erreurs, il n'est pas exclu, quoique peu probable, que le positionnement ait influencé la captation des tumeurs. Cet aspect devra être investigué davantage dans des études ultérieures. Aussi, la tumeur dorsale gauche (MC4-L2 ER+) surtout, mais aussi la dorsale droite (MC4-L2 ER α KD) se retrouvent très près du foie, un organe accumulant des doses importantes de FES ou de 4FMFES. Par contre, cette accumulation résultant plus du métabolisme (transitoire) que d'une captation spécifique, la concentration de traceur y décroît avec le temps (clairance hépato-biliaire).

5.2.3. Suivi de traitements d'hormonothérapie

Les lignées MC7-L1 et MC4-L2 sont connues pour être sensibles *in vivo* à des traitements d'hormonothérapie, tel le tamoxifène, le raloxifène, l'exemestrane et le letrozole (Aliaga *et al.*, 2004). En effet, selon cette étude, de telles thérapies, lorsqu'appliquées à partir du moment de l'implantation, inhibent la croissance de ces tumeurs au bout de 6 à 7 semaines. Ainsi, de faibles doses d'exemestrane (5 mg/kg/jour), ainsi que l'utilisation du tamoxifène (à 8 mg/kg et 16 mg/kg/jour) a eu un effet modéré sur la croissance tumorale, tandis que le letrozole (5 mg/kg/jour) et de plus fortes doses d'exemestrane (25 mg/kg/jour) ont fortement retardé la croissance des tumeurs.

Dans la présente étude, des suivis de croissance par imagerie TEP au FDG et à la [¹¹C]-méthionine ([¹¹C]-MET) ont été faits sur des souris porteuses de tumeurs MC7-L1 (ER+) et MC7-L1 ER α KD traitées soit au tamoxifène (8 mg/kg/jour), au letrozole (5 mg/kg/jour) ou au fulvestrant (0,5 mg). Le choix de ces

agents thérapeutiques a été fait dans le but d'avoir un représentant de chaque classe d'hormonothérapie existante (à l'exception de la sous-classe des inhibiteurs d'aromatase stéroïdiens), soit les modulateurs sélectifs des ER (tamoxifène), les inhibiteurs d'aromatase (letrozole) et les antagonistes des ER (fulvestrant). Outre l'usage de l'imagerie TEP, plusieurs différences sont à noter par rapport aux travaux antérieurs. D'abord, les études effectuées par A. Aliaga (Aliaga *et al.*, 2004) débutaient les traitements dès le premier jour de l'implantation pendant 7 semaines, tandis que le présent protocole débute les traitements sur des tumeurs matures (entre 15 et 20 mm³) sur 14 jours, représentant une approche plus thérapeutique que prophylactique, quoique à plus court terme. Une autre étude de ce même auteur (Aliaga *et al.*, 2007), plus récente, débute différents traitements de chimiothérapie et de letrozole lorsque les tumeurs MC7-L1 et MC4-L2 atteignent 100 mm³ pour en faire le suivi à l'imagerie TEP au FDG sur 14 jours. Or des signes évidents de nécrose sont visibles sur les tranches axiales TEP de tumeurs, même parfois au jour 0, rendant difficile de distinguer l'effet des thérapies de la nécrose. La présente étude contourne ce problème; en débutant avec des tumeurs de taille plus modeste, le suivi des traitements d'hormonothérapie pendant 14 jours a pu se faire sans signe de nécrose dans la forte majorité des cas. Ensuite, le fulvestrant n'avait pas été évalué dans les précédents travaux. Or, seul le fulvestrant montre une inhibition à court terme de la croissance des tumeurs MC7-L1 (au bout de 14 jours) dans la présente étude, donnant un indice du potentiel de cette thérapie contre les lignées ER+. Dues à des limitations techniques, les lignées MC4-L2 et MC4-L2 ER α KD n'ont pas été évaluées pour le suivi de traitement. En effet, le modèle à 4 tumeurs n'est pas applicable à l'imagerie TEP à la [¹¹C]-MET; le foie captant beaucoup de ce radiotraceur. Or, l'acquisition des images débutant seulement 10 minutes après l'injection du [¹¹C]-MET (à cause de la courte demi-vie de l'isotope et de la cinétique rapide du traceur), le signal émanant du foie contamine fortement les signaux tumoraux du dos. Le suivi de 4 groupes de traitement sur une seule paire de tumeurs ayant nécessité environ 25 synthèses de [¹¹C]-MET, il aurait été ambitieux de doubler l'étude pour le suivi des 2 variantes de tumeurs MC4-L2. Par contre, considérant les différences de patrons

d'expression génétique induit par la répression d'ER α dans les cellules MC4-L2 par rapport aux lignées MC7-L1, il aurait été intéressant de voir si le même comportement *in vivo* avait été observé sous hormonothérapie.

Le suivi des différents traitements de la captation des traceurs par imagerie a été à première vue un succès, compte tenu que dans la plupart des cas, une différence de captation significative a été observée entre la tumeur ER+ et la tumeur ER α KD après 7 et 14 jours de traitement. Néanmoins, les comparaisons des groupes de traitements avec le groupe non-traité (contrôle) pointent vers des conclusions un peu plus nuancées. En effet, bien que les traitements au fulvestrant et au letrozole ont mené à une baisse significative de captation de FDG et de [¹¹C]-MET par rapport au contrôle correspondant chez les tumeurs ER+ (à l'exception notable du traitement au letrozole après 14 jours au FDG), la thérapie au tamoxifène ne provoque pas de diminution notable de la captation tumorale ER+. Considérant le succès mitigé que le tamoxifène a eu dans l'inhibition de la croissance des tumeurs MC7-L1 sur 7 semaines de traitement (Aliaga *et al.*, 2004), il n'est pas étonnant que le suivi court terme de croissance et par imagerie, tant au FDG qu'à la [¹¹C]-MET, ait mis en évidence une absence d'effet de cet agent thérapeutique à court terme. Quant aux tumeurs ER α KD, aucune différence entre les groupes de traitement et le contrôle n'est observée, à l'exception du jour 14 de traitement au tamoxifène, où le groupe traité capte plus de [¹¹C]-MET que le groupe contrôle (le jour 14 suivi au FDG est presque significatif). Ainsi, autant la TEP au FDG qu'à la [¹¹C]-MET (et la mesure de la taille des tumeurs) prédit une absence de réponse au tamoxifène à court terme, avec une réponse à long terme inconnue (due aux limitations du protocole).

6. Résultats préliminaires et complémentaires

6.1. Imagerie de la prolifération

En clinique, l'imagerie TEP à la 3'-désoxy-3'-fluorothymidine (FLT) gagne en popularité, notamment grâce à sa capacité de visualiser la prolifération tumorale et à son fort potentiel dans certains tissus (tel le cerveau) et pour certains types de tumeurs. Or, l'utilisation du FLT dans les études précliniques est limitée par la faible captation spécifique de ce traceur chez les rongeurs, ce qui limite l'accumulation de données autre que clinique. Certains groupes ont toutefois réussi à utiliser le FLT dans des modèles de rongeurs avec des succès mitigés par différentes techniques, notamment l'injection de l'enzyme thymidine phosphorylase précédant l'injection de FLT (van Waarde *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009). Considérant le potentiel de suivre la prolifération des tumeurs sous hormonothérapie par imagerie TEP au FLT, un protocole de pré-injection de thymidine phosphorylase dans des souris a d'abord été développé. Ainsi, considérant que selon certains auteurs, la dose de 1U/g de thymidine phosphorylase permet de visualiser des tumeurs par imagerie TEP au FLT, cette dose a été considérée comme point de départ. L'injection intraveineuse de 1U/g de l'enzyme à des souris Balb-c a permis de diminuer les taux de thymidine circulantes sous les seuils de détection d'un détecteur UV couplé à un chromatographe liquide haute pression (HPLC), et ce sur 1 heure (Figure 7).

Cette même dose d'enzyme (1U/g) a ensuite été utilisée pour l'imagerie TEP au FLT des tumeurs MC7-L1 et MC4-L2 (autant ER+ que ER α KD) implantées à des souris Balb/c, puis comparée avec des souris sans enzyme. La captation spécifique dans certains tissus (notamment la moelle osseuse) a augmenté de façon marginale avec le traitement enzymatique, tandis que les tumeurs n'ont pas pu être visualisées, aussi bien avec que sans enzyme (Figure 8).

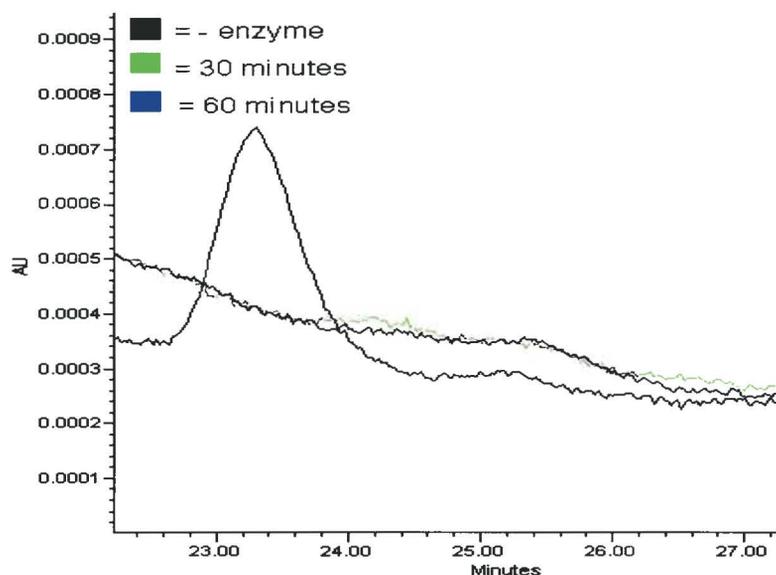


Figure 7 : Chromatographie liquide haute pression d'échantillons de sang de souris précipité à l'acétone, pris avant injection de thymidine phosphorylase (-enzyme) ou 30 et 60 minutes suivant l'injection de 1 U/g de l'enzyme. Les échantillons sont séparés par une colonne phase inverse C-18 avec comme éluant du tampon phosphate 25 mM, pH 5,5, à un débit de 1 ml/min. Le pic correspondant à la thymidine est à $t = 23,3$ minutes.

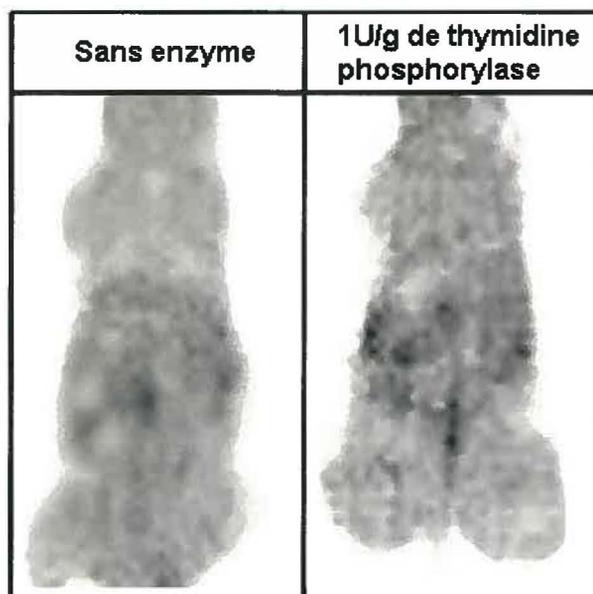


Figure 8 : Image TEP coronale représentative au FLT de souris porteuses de tumeurs MC7-L1 et MC4-L2 (version ER+ ou ER α KD), sans injection préalable d'enzyme ou avec traitement de 1 U/g de thymidine phosphorylase immédiatement après injection de 25 MBq de FLT. Les images ont été prises en double échantillonnage 1 heure suivant l'injection de FLT.

Enfin, un essai d'imagerie TEP au FLT a été effectué sur un rat Fischer portant une tumeur F98 (gliome) au cerveau. Ainsi, la même dose que chez la souris, de 1U/g de thymidine phosphorylase, a été utilisée chez le rat. Bien que le FLT offre un grand potentiel d'imagerie de tumeurs cérébrales en clinique (compte tenu de la très faible captation de FLT des tissus cérébraux sains, donc du faible bruit de fond), le gliome implanté au rat n'a pu être visualisé (figure 9). Une imagerie par résonance magnétique (IRM) subséquente a pu confirmer la présence d'une tumeur d'environ 4 mm.

L'ensemble de ces données préliminaires a montré que l'usage du FLT comme agent d'imagerie tumoral est d'une portée étant au mieux limitée chez les rongeurs. Malgré que les traitements à la thymidine phosphorylase à 1 U/g ont permis de réduire les taux endogènes de thymidine sous les limites de détection du détecteur à l'UV couplé à l'HPLC, la captation spécifique de FLT telle que visualisée par imagerie TEP a été décevante. D'autres facteurs devront être pris en considération, et d'autres optimisations devront être apportées pour permettre l'utilisation de ce traceur dans des modèles de rongeurs de manière satisfaisante.

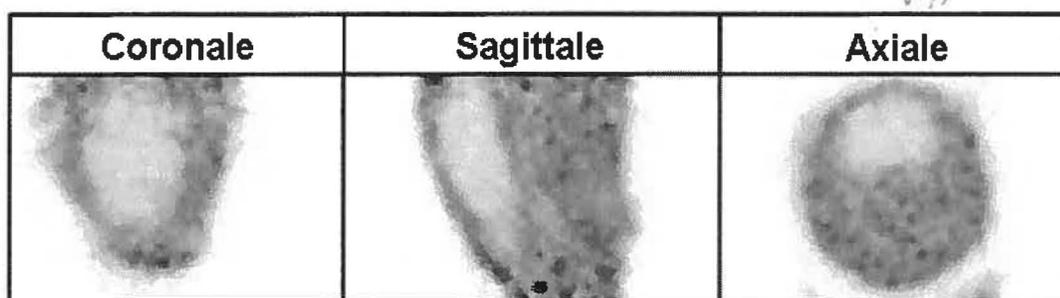


Figure 9: Image cérébrale TEP coronale, sagittale et axiale représentative au FLT de rat porteur d'une tumeur F98 avec traitement de 1 U/g de thymidine phosphorylase immédiatement après injection de 37 MBq de FLT. Les images ont été prises en double échantillonnage 1 heure suivant l'injection de FLT.

6.2 Résultats préliminaires TEP clinique au FES et 4FMFES

Les résultats obtenues dans cette section ont été présentés à des congrès internationaux (Paquette et al., 2012, Paquette et al., 2012, Turcotte et al., 2012).

Suivant une étude clinique de phase I portant sur l'innocuité et la dosimétrie du 4FMFES sur des sujets sains (Beauregard *et al.*, 2009), une étude clinique de phase II visant à comparer l'imagerie TEP au 4FMFES avec celle du FES chez des patientes atteintes d'un cancer du sein a débuté en octobre 2010, et est présentement en cours. À ce jour, 17 patientes ont été imagées successivement à l'aide des 2 traceurs (avec un intervalle d'au moins 48 heures entre chaque séance), et 1 patiente a été imagée au 4FMFES seulement. Les résultats préliminaires ont fait l'objet de quelques présentations à des congrès internationaux (Paquette *et al.*, 2012; Paquette *et al.*, 2012; Turcotte *et al.*, 2012), mais n'ont toujours pas été publiés. Un exemple d'imagerie TEP corps entier au FES et au 4FMFES sur une même patiente est présenté à la figure 10.



Figure 10 : Exemple type d'images TEP corps entier au FES et au 4FMFES d'une même patiente ayant une lésion primaire au sein gauche. Bien que les 2 traceurs présentent une distribution très similaire (foie, intestins, etc), le bruit de fond est moins élevé pour le 4FMFES que pour les FES.

Dans tous les cas, le 4FMFES a produit des images TEP présentant un signal non-spécifique (bruit de fond) significativement inférieur à celui du FES pour tous les tissus analysés (Figure 11). Aussi, il y a beaucoup moins de variations de signal entre le sang et les différents tissus non-spécifiques en utilisant le 4FMFES. De plus, il y a moins de différence de captation entre les tissus musculaires et graisseux en utilisant le 4FMFES, ce qui donne (combiné à la faible captation sanguine) une impression de plus grande uniformité de la captation non-spécifique. Seuls le foie et les intestins produisent un fort bruit de fond chez les 2 traceurs, résultant du métabolisme et de l'élimination des stéroïdes comme le FES et le 4FMFES. Néanmoins, la captation tumorale standardisée (SUV : *Standard Uptake Value*) de la TEP au 4FMFES est similaire (seins) ou inférieure (axillaire, poumons et os) à celle du FES (figure 12). Or, la captation tumorale égale ou légèrement plus basse du 4FMFES par rapport au FES est plus que compensée par les plus faibles signaux des tissus non-spécifiques, en particulier dans le sang, produits par la TEP au 4FMFES. Par conséquent, bien que variant selon le site de la lésion (dû à la captation des tissus environnant la tumeur), le contraste tumoral est meilleur pour toutes les lésions observées au 4FMFES comparé au FES (Tableau 1). Ainsi, plusieurs foyers tumoraux considérés comme négatifs ou équivoque au FES ont été évalués comme étant positifs par TEP au 4FMFES. Un exemple à la figure 13 montre trois métastases pulmonaires détectées à la TDM et à la TEP au 4FMFES, mais seulement une lésion a été considérée comme positive par TEP au FES. Un deuxième cas de lésions primaires et axillaires difficiles à détecter au FES, mais clairement identifiées à la TEP au 4FMFES, est présenté à la figure 14.

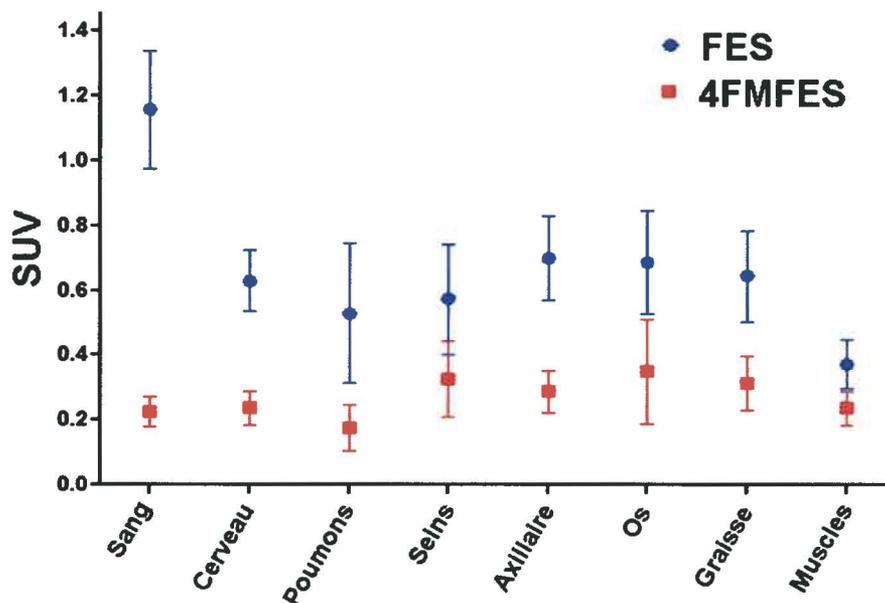


Figure 11: Captation (SUV) de FES et de 4FMFES des tissus non-spécifiques chez des patientes, évaluée par imagerie TEP. Les signaux sont plus faibles ($p < 0,05$) et uniformes pour le 4FMFES que pour le FES.

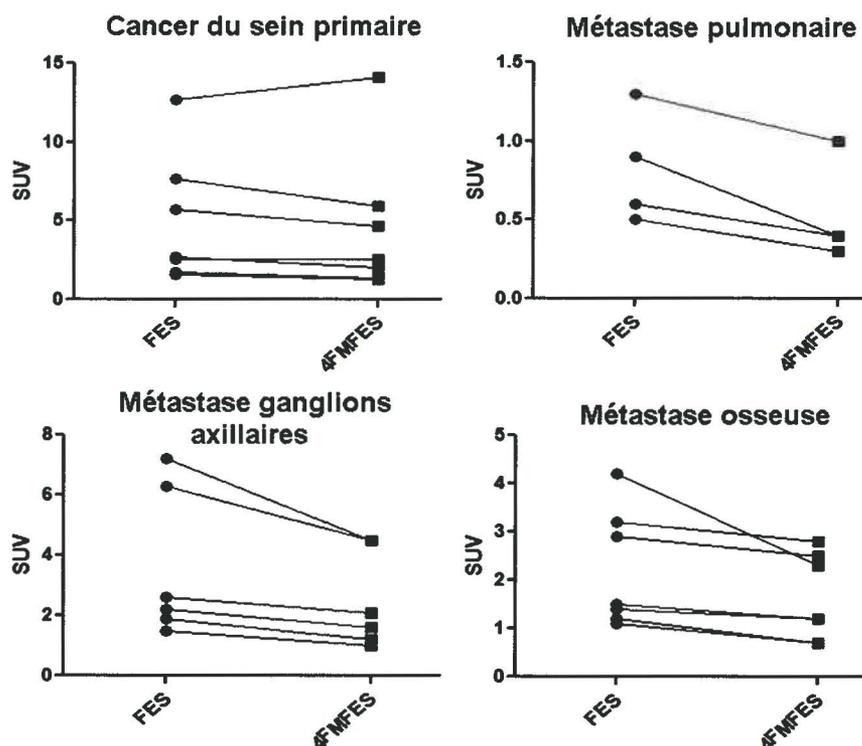


Figure 12: Captation tumorale (SUV) de FES et de 4FMFES chez des patientes, évaluée par imagerie TEP, selon le site des lésions. La captation est similaire pour les deux traceurs lors de lésions primaires du sein, alors que la captation est plus faible pour le 4FMFES lors de métastases axillaires, pulmonaires ou osseuses ($p < 0,05$).

Site de la tumeur	FES T/B	4FMFES T/B	4FMFES/FES
Seins	8,7±4,1	14,1±4,5	1,6±0,6
Axillaire	5,1±2,5	8,6±1,6	1,7±0,5
Poumons	1,6±0,4	5,1±0,3	3,2±0,2
Os	3,0±1,2	4,3±0,9	1,4±0,5

Tableau 1 : Ratio tumeur sur bruit de fond (T/B) de la TEP au FES et au 4FMFES, représentatif du contraste tumoral, de différents sites métastatiques. La TEP au 4FMFES apporte un gain significatif de contraste ($p < 0,05$) sur le FES à tous les sites. Ce gain en faveur du 4FMFES est de 1,4 fois (os) à 3,2 fois (poumons) le contraste observé par TEP au FES.

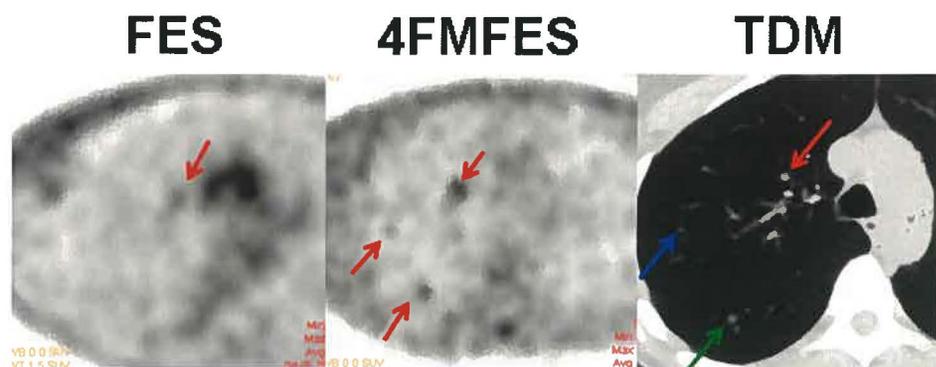


Figure 13 : Exemple d'image TEP au FES et au 4FMFES (coupe axiale) d'une même patiente ayant des métastases pulmonaires, ainsi qu'une tomodensitométrie (TDM) dans la même tranche axiale. Alors qu'une seule lésion aurait été détectée à la TEP au FES, 3 ont pu être clairement identifiées par TEP au 4FMFES. Le TDM a pu confirmer la présence des lésions de 5 mm (flèche rouge), 4 mm (flèche verte) et 2 mm (flèche bleue). Dans le but d'obtenir des bruits de fond équivalents pour les 2 traceurs, la saturation de l'image est 6 fois plus élevée dans l'image 4FMFES que dans l'image FES.

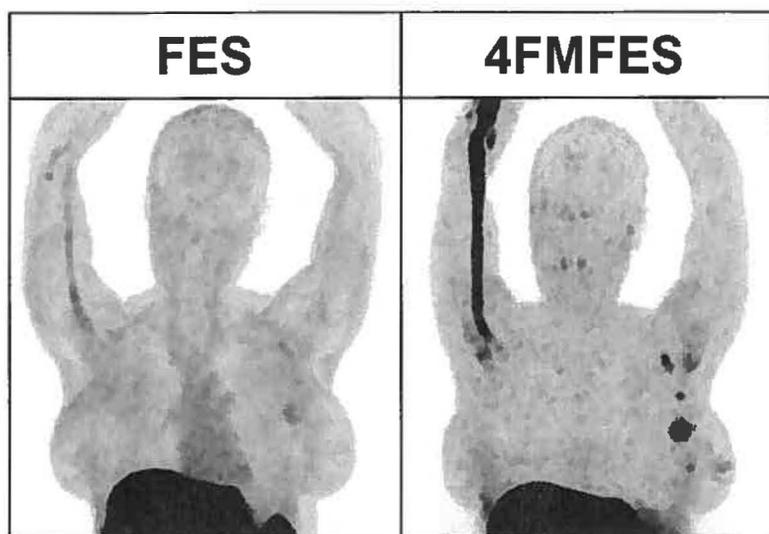


Figure 14 : Exemple d'image TEP au FES et au 4FMFES d'une même patiente ayant des lésions primaires et axillaires. Alors que les lésions sont difficilement détectées à la TEP au FES, elles se distinguent clairement par TEP au 4FMFES. La saturation de l'image au 4FMFES est plus élevée que dans l'image au FES, ce qui explique les bruits de fond comparables dans les 2 images. Dans le but d'obtenir des bruits de fond équivalents pour les 2 traceurs, la saturation de l'image est 2 fois plus élevée dans l'image 4FMFES que dans l'image FES.

Plusieurs phénomènes expliquent le meilleur contraste tumoral de la TEP au 4FMFES par rapport au FES. D'abord, les courbes d'activité sanguine, obtenues par suivi dans le temps d'une région d'intérêt dans la cavité ventriculaire sur les images TEP, montrent que le 4FMFES est deux fois moins présent dans le sang que le FES 60 minutes après l'injection du traceur. Ce résultat a déjà été observé dans une étude précédente (Beauregard *et al*, 2009). Ce résultat semble en contradiction avec la figure 11, où il est montré que le SUV sanguin est 5 à 6 fois moins élevé pour le 4FMFES (et non pas 2 fois). Or, les courbes d'activité sanguines montrent le contenu brut (en unité arbitraire) du compartiment sanguin, sans tenir compte du bruit de fond, alors que les SUV représentent la concentration d'activité normalisée dans chaque voxel de l'image. Ensuite, alors que le FES s'accumule deux fois plus dans les tissus adipeux que dans les muscles (ratio 2,06:1), contribuant au bruit de fond, il y a relativement moins de différence entre la captation adipeuse et musculaire du 4FMFES (1,56 :1). Enfin, une analyse des métabolites plasmatiques de chaque traceur dans le temps a été

effectuée par autoradiographie de plaques de chromatographie sur couche mince en phase inversée (Figure 15).

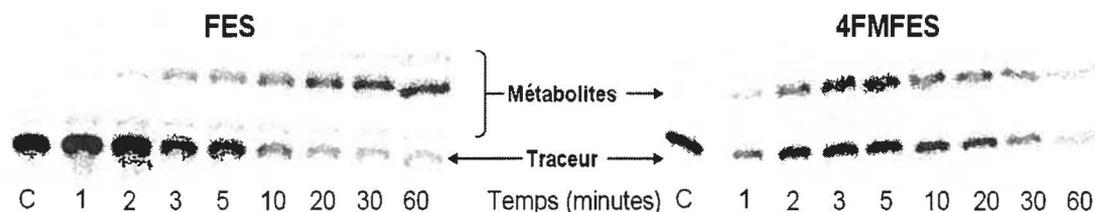


Figure 15: Chromatographie sur couche mince (TLC) en phase inversée d'échantillons de plasma (additionnés de 5 volumes de méthanol pour précipiter les protéines), prélevés à différents temps suivant l'injection de FES ou de 4FMFES à des patientes. C = traceur ajouté à du plasma, puis additionné de 5 volumes de méthanol.

Trois observations ont pu être tirées de cette analyse de métabolites. En premier lieu, il y a formation de 3 métabolites radioactifs distincts suivant l'injection de FES, alors qu'un seul métabolite est visible pour le 4FMFES. Tous les métabolites observés sont plus polaires que les traceurs intacts. En deuxième lieu, alors qu'il ne reste que moins de 20% de FES intact 60 minutes suivant son injection, 50% de la radioactivité présente dans le plasma est sous la forme de 4FMFES non métabolisé 60 minutes post-injection (Figure 16). Ces 2 premières observations (nombre de métabolites, et quantité relative de métabolites réduits pour le 4FMFES par rapport au FES) expliquent en grande partie le meilleur contraste du 4FMFES. En effet, les métabolites du FES, représentant plus de 80% de la radioactivité plasmatique totale, et étant connues comme ayant une faible affinité pour les sites spécifiques et les récepteurs d'œstrogène (Mankoff *et al*, 1997), génèrent du signal non-spécifique contribuant au bruit de fond de l'image et réduisant ainsi le contraste. Bien qu'il soit attendu que le métabolite du 4FMFES ait aussi une faible affinité pour les cibles (et génère aussi du signal non spécifique), le fait qu'il soit en quantité deux fois et demi moindre que les métabolites dérivés du FES réduit d'autant le signal non spécifique. En troisième lieu, le métabolisme hépatique humain de ces deux traceurs stéroïdiens est plus lent et génère moins de métabolites que chez la souris. Donc, les meilleures performances cliniques du 4FMFES par rapport au FES semblent être dues à une combinaison d'une

meilleure clairance sanguine, d'une moins grande accumulation dans les graisses et par une métabolisation moindre.

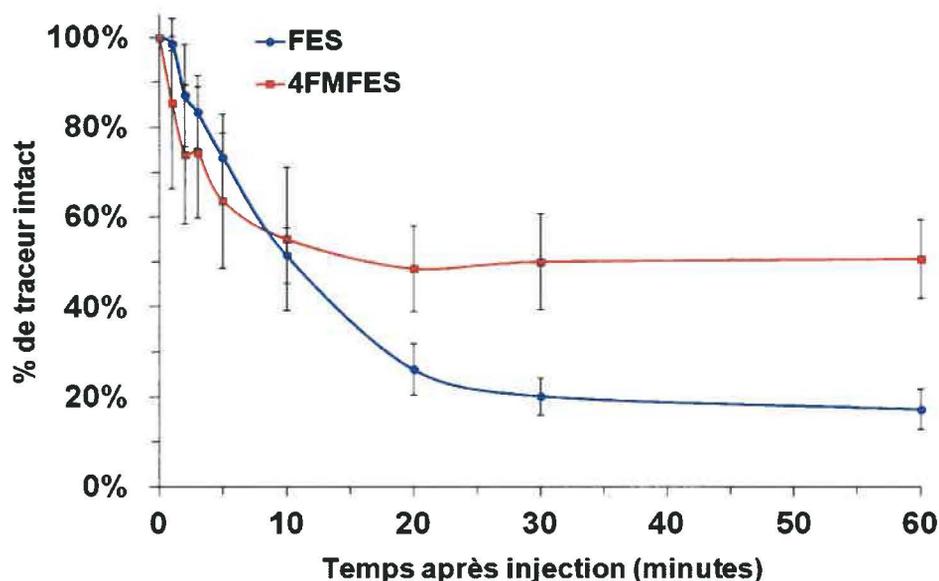


Figure 16 : Suivi dans le temps du % de traceur non métabolisé suivant l'injection de FES ou de 4FMFES à des patientes. Les résultats sont l'expression du ratio de la bande de TLC correspondant au traceur pur sur le total de la radioactivité de l'échantillon. Le n varie de 9 à 11 selon les temps, à l'exception de FES, 1 minute ($n = 3$), et de 4FMFES, 1 minute ($n = 5$). Une différence significative (test de Student bilatéral pairé) est observée entre les 2 traceurs aux temps 20 minutes ($p < 0,005$), ainsi que 30 et 60 minutes ($p < 0,0005$).

Or, le 4FMFES apporte une amélioration de contraste par rapport au FES pas mal plus modeste (mais significative) chez la souris qu'en clinique, alors que le 4FMFES est autant métabolisé que le FES chez la souris (et plus rapidement que chez la femme). D'un autre côté, le 4FMFES a une meilleure clairance sanguine que le FES et un ratio graisse/muscles plus faible chez la souris (Bénard *et al*, 2008) qui peuvent expliquer le (faible) gain de contraste et de captation du 4FMFES sur le FES dans un modèle murin. Par contre, la quantité réduite de métabolites plasmatiques du 4FMFES semble être le point crucial pour expliquer les importants gains de contraste obtenus en utilisant le 4FMFES au lieu du FES en clinique.

Par ailleurs, ces différences interespèces quant aux quantités relatives de métabolites des deux traceurs et du gain en contraste de l'imagerie TEP au 4FMFES sur l'imagerie TEP au FES rappelle qu'il vaut mieux être prudent lorsque l'on transpose des données obtenues chez l'animal vers l'humain. Dans ce cas-ci, le chevauchement partiel dans le temps des études animales et cliniques a permis d'éviter une sous-estimation du potentiel du 4FMFES pour l'imagerie des ER. En effet, les données précliniques prises isolément auraient pu amenuiser l'intérêt de cette nouvelle molécule pour la clinique, considérant le mince bénéfice que procure le 4FMFES sur le FES chez la souris. Ce même raisonnement vaut aussi pour le FLT, un autre traceur d'une grande utilité en clinique mais aux résultats très décevants chez le rongeur, et par extension à toute recherche translationnelle.

7. Conclusions et perspectives

La création de lignées isogéniques, mais dont l'expression d'ER α est réprimée de manière stable, à partir des adénocarcinomes mammaires murins MC7-L1 et MC4-L2, a été un succès. En effet, tant les tests biochimiques que pharmacologiques, tant les études *ex vivo* que d'imagerie TEP au FES et au 4FMFES, ont démontré une baisse partielle mais marquée des niveaux d'ER α dans les lignées ER α KD. Un modèle comparatif de souris porteuse de tumeurs soit ER+, soit ER α KD, a permis non seulement d'appliquer une méthode d'imagerie quantitative au FES, mais a aussi donné l'occasion de comparer les performances du 4FMFES à celle du FES comme agents d'imagerie des récepteurs d'œstrogène. Fort de ces résultats, ce modèle serait tout à fait adapté pour l'évaluation *ex vivo* et en imagerie de nouveaux traceurs (TEP, tomographie d'émission monophotonique) ou sondes (imagerie par résonance magnétique, optique) ayant comme cible les ER. Une autre application de ce modèle pour l'imagerie des ER serait l'optimisation des traceurs existants, notamment en inhibant leur métabolisme. Ainsi, la sulfatation étant l'une des principales voies de métabolisation du FES (Mankoff *et al.*, 1997), l'utilisation de la tricine (4',5,7-trihydroxy-3',5'-diméthoxyflavone) comme inhibiteur potent (IC₅₀=1,5 nM) de l'estrogène sulfotransférase hépatique (Waring *et al.*, 2008) pourrait améliorer significativement l'imagerie au FES et/ou au 4FMFES.

Dans une seconde étude, il a été possible de voir un effet à court terme de certaines hormonothérapies (surtout le letrozole et le fulvestrant) par suivi en imagerie TEP au FDG et au [¹¹C]-MET sur la lignée MC7-L1, alors qu'aucune différence de captation n'a été observée sur la lignée MC7-L1 ER α KD entre un groupe contrôle et les groupes traités. Ainsi, le modèle de souris porteuse de tumeurs ER+/ER α KD, combiné à l'imagerie TEP, aurait un grand potentiel pour évaluer de nouvelles thérapies ciblant les ER (van Themsche *et al.*, 2009; Foster *et al.*, 2008). De même, l'apparente résistance des tumeurs ER α KD aux

traitements hormonaux indique que cette lignée serait peut-être indiquée pour l'étude de traitements ciblant les tumeurs hormonorésistantes (Schiff *et al.* 2004), surtout que cette lignée comporte une modification du patron d'expression des gènes (notamment une surexpression d'ErbB2). Bien que les lignées MC4-L2 et MC4-L2 ER α KD n'aient pas été étudiée par imagerie TEP sous hormonothérapie, le fait que la répression d'ER α ait provoqué de différents changements d'expression des gènes observés que dans la lignée MC7-L1 ER α KDest indicatif qu'il serait intéressant de comparer le comportement de ces 2 lignées sous hormono- ou chimiothérapie.

L'imagerie TEP au FLT de modèles de rongeurs a été un échec, malgré la supplémentation des animaux en thymidine phosphorylase. En effet, bien qu'une importante diminution des taux de thymidine endogène ait été observée, la captation spécifique de FLT ne s'est pas améliorée de façon notable, autant chez la souris porteuse de tumeurs mammaires que chez le rat porteur de gliomes au cerveau. Or, la thymidine circulante (9 à 16 fois plus élevée chez les rongeurs que chez l'humain) a été décrite comme un des principaux facteurs nuisant à la captation de FLT chez le rongeur. Puisque certains groupes de recherche ont quant à eux réussi l'imagerie TEP au FLT des tumeurs implantées sur des rongeurs (Yang *et al.*, 2006; Solit *et al.*, 2007; entre autres), il serait intéressant en perspective d'optimiser davantage et d'adapter les protocoles pour l'imagerie TEP au FLT, au-delà de l'injection de thymidine phosphorylase. En premier lieu, certains types de tumeurs ont certainement de plus hauts taux de thymidine kinase (TK) et/ou un indice de prolifération plus élevé que les lignées MC7-L1 et MC4-L2, et constituerait ainsi un meilleur modèle pour l'imagerie au FLT. En parallèle, des lignées transfectées par un plasmide ou infectées par un vecteur viral permettant la surexpression de la TK pourraient capter le FLT suffisamment pour en faire un bon modèle d'imagerie. En deuxième lieu, il est possible que les taux endogènes de thymidine varient d'une race de souris ou de rat à l'autre. Ainsi, l'utilisation de races de rongeurs à faible teneur en thymidine serait une alternative intéressante à l'injection de thymidine phosphorylase. Enfin, un pré-traitement à la 5-fluoro-2'-

deoxyuridine à faible dose semble prometteur pour améliorer de façon substantielle la captation tumorale du FLT dans les modèles animales (Viertl *et al*, 2011).

Bien que l'objet de cette thèse fut sur la répression d'ER α , d'autres gènes que ER α auraient été intéressants à moduler dans le but de tester d'autres traceurs ou de suivre certaines thérapies. Des études pilotes ont été tentées pour réprimer le gène ER β dans les lignées MC7-L1 et MC4-L2. Or, les niveaux d'ER β étant naturellement très faibles dans ces lignées, cette avenue a été rapidement abandonnée. Néanmoins, la surexpression stable de ce gène par introduction d'un vecteur viral d'expression dans ces lignées pourrait constituer la base d'un modèle visant à élucider le rôle d'ER β dans le cancer du sein. Bien d'autres gènes pertinents pour le cancer du sein seraient intéressants à moduler (par exemple, p53, certaines caspases, les récepteurs de facteurs de croissance, etc), mais de telles études seront laissées pour des travaux ultérieurs. Aussi, l'expression du gène ErbB2, reconnu pour avoir un rôle dans le développement de résistance aux hormonothérapies, serait également intéressante à moduler pour évaluer des thérapies hormonales ou des immunothérapies ciblant ErbB2 dans un modèle animal par imagerie TEP.

Enfin, selon les résultats préliminaires de l'étude clinique de phase II en cours, la TEP au 4FMFES est un excellent candidat pour l'évaluation du statut en ER du cancer du sein. De plus, il serait intéressant d'étendre l'utilisation de la TEP au 4FMFES à d'autres fins que pour les cancers du sein. En effet, certains cancers de l'endomètre (et autres cancers gynécologiques) surexpriment aussi ER α ; leur étude par imagerie TEP dans un modèle animal ou en clinique serait d'un grand intérêt.

8. Remerciements

D'abord, je voudrais remercier mes directeurs de recherche, le Pr Roger Lecomte et le Dr François Bénard, pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires et pour avoir supervisé mon doctorat. Je remercie avec beaucoup d'emphase Marilyn Desmarais, ma femme, qui a été un support moral et financier essentiel pour mon cheminement personnel et professionnel. Je me dois aussi de remercier les membres de mon jury, pour leurs commentaires pertinents et leur encadrement au sujet de la thèse. Enfin, je voudrais remercier tous les collègues, superviseurs et employés du département que j'ai pu côtoyer ou qui sont encore présents, et qui ont contribué de près ou de loin à l'avancement de mes projets.

9. Liste des références

Ahmed N, Garcia G, Ali H, van Lier JE (2009). ^{18}F of A-ring substituted 16α -fluoro-estradiols as potential radiopharmaceuticals for PET imaging. *Steroids* **74**: 42-50.

Aliaga A, Rousseau JA, Ouellet R, Cadorette J, van Lier JE, Lecomte R, Bénard F (2004). Breast cancer models to study the expression of estrogen receptors with small animal PET imaging. *Nucl Med Biol* **31**:761-770.

Aliaga A, Rousseau JA, Ouellet R, Croteau E, van Lier JE, Lecomte R, Bénard F (2007). A small animal positron emission tomography study of the effect of chemotherapy and hormonal therapy on the uptake of 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D-glucose in murine models of breast cancer. *Mol Imaging Biol* **9**:144-150.

Ali H, Rousseau J, Ghaffari MA, van Lier JE (1991). Synthesis, receptor binding, and tissue distribution of 7α - and 11β -substituted ($17\alpha,20\text{E}$)- and ($17\alpha,20\text{Z}$)-21-[^{125}I]iodo-19-norpregna-1,3,5(10),20-tetraene-3,17-diols. *J Med Chem* **34**:854-860.

Ali H, Rousseau JA, van Lier JE (1993). 7 alpha-Methyl- and 11 betaethoxy-substitution of [^{125}I]-16 alpha-iodoestradiol: effect on estrogen receptor-mediated target tissue uptake. *J Med Chem* **36**:264-271.

Amarzguioui M, Holen T, Babaie E, Prydz H (2003). Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucl Acid Res* **31(2)**:589-595.

Angali SA, Hedayati SS, Poor RH, Madani S, Poor SS, Panahi S (2010). Application of RNA interference in treating human diseases. *J Genet* **89(4)**:527-537.

Annab LA, Hawkins RE, Solomon G, Barrett JC, Afshari CA (2000). Increased cell survival by inhibition of BRCA1 using an antisense approach in an estrogen responsive ovarian carcinoma cell line. *Breast Cancer Res* **2**:139-148.

Anolik JH, Klinge CM, Hilf R, Bambara RA (1995). Cooperative binding of estrogen receptor to DNA depends on spacing of binding sites, flanking sequence, and ligand. *Biochemistry* **34(8)**:2511-2520.

Arnett-Mansfield RL, deFazio A, Wain GV, Jaworski RC, Byth K, Mote PA, Clarke CL (2001). Relative expression of progesterone receptors A and B in endometrioid cancers of the endometrium. *Cancer Res* **61**:4576-4582.

Bading JR, Shields AF (2008). Imaging of cell proliferation: status and prospects. *J Nucl Med* **49**:64S-80S.

Balfe PJ, McCann AH, Welch HM, Kerin MJ (2004). Estrogen receptor beta and breast cancer. *Eur J Surg Oncol* **30(10)**:1043-1050.

Bao Q, Chatziioannou AF (2010). Estimation of the minimum detectable activity of preclinical PET imaging systems with an analytical method. *Med Phys* **37(11)**: 6070-6083.

Bardin A, Boulle N, Lazennec G, Vignon F, Pujol P (2004). Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer* **11**:537-51.

Bartelli G, Paridaens R (2006). Optimal sequence of hormonotherapy in advanced breast cancer. *Curr Opin Oncol* **18**:572-577.

Bauerfeind I, Elling D, Heinemann V (2010). Lapatinib in the treatment of hormone receptor-positive/ErbB2-positive breast cancer. *Breast Care* **5(suppl 1)**:13-15.

Bazley LA, Gullick WJ (2005). The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer* **12**:S17-S27.

Beauregard JM, Croteau E, Ahmed N, van Lier JE, Bénard F (2009). Assessment of human biodistribution and dosimetry of 4-fluoro-11 β -methoxy-16 α -¹⁸F-fluoroestradiol using serial whole-body PET/CT. *J Nucl Med* **50**:100-107.

Beatson GT (1896). On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet* **148(3802)**:104-107.

Beatson GT (1896). On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet* **148(3803)**:162-165.

Bénard F, Nassem A, Beauregard JM, Rousseau JA, Aliaga A, Dubuc C, Croteau E, van Lier JE (2008). [¹⁸F]Fluorinated estradiol derivatives for oestrogen receptor imaging: impact of substituents, formulation and specific activity on the biodistribution in breast tumour-bearing mice. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **35**:1473-1479.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**: 363-366.

Bhattacharyya A, Ear US, Koller BH, Weichselbaum RR, Bishop DK (2000). The breast cancer susceptibility gene BRCA1 is required for subnuclear assembly of Rad51 and survival following treatment with the DNA cross-linking agent cisplatin. *J Biol Chem* **275**: 23899-23903.

Birnbaum MJ, Haspel HC, Rosen OM (1987). Transformation of rat fibroblasts by FSV rapidly increases glucose transporter gene transcription. *Science* 235(4795): 1495-1498.

Boron WF, Boulpaep EL (2003). *Medical Physiology: A Cellular And Molecular Approach*, page 1300, Elsevier/Saunders.

Bos R, van der Hoeven JJM, van der Wall E, van der Groep P, van Diest PJ, Comans EFI, Joshi U, Semenza GL, Hoekstra OS, Lammertsma AA, Molthoff CFM (2002). Biologic correlates of ¹⁸Fluorodeoxyglucose uptake in human breast cancer measured by positron emission tomography. *J Clin Oncol* 20(2):379-387.

Boyce, BF, Xing L, Franzoso G, Siebenlist U (1999). Required and nonessential functions of nuclear factor-κB in bone cells. *Bone* 25: 137-139.

Brodie A, Jelovac D, Macedo L, Sabnis G, Tilghman S, Goloubeva O (2005). Therapeutic observations in MCF-7 aromatase xenografts. *Clin. Cancer Res* 11:884-888S.

Brumellkamp TR, Bernards R, Agami R (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296(5567):550-553.

Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ, Picard D (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J* 15:2174-2183.

Burnett JC, Rossi JJ, Tiemann K (2011). Current progress of siRNA/shRNA therapeutics in clinical trials. *Biotechnol J* 6:1130-1146.

Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:8033-8037.

Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinidou D, Ali S, Nakshatri H (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem* 276:9817-9824.

Carani C, Qin K, Simoni M, Faustini-Fustini M, Serpanti S, Boyd J, Korach KS, Simpson ER (1997). Aromatase deficiency in the male: effect of testosterone and estradiol treatment. *N Engl J Med* 337:91-95.

Castagnetta L, Traina A, DiCarlo A, Latteri A, Carruba G, Leake R, 1987. Heterogeneity of soluble and nuclear oestrogen receptor status of involved nodes in relation to primary breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 23:31-35.

Chen J (2000). Ataxia telangiectasia-related protein is involved in the phosphorylation of BRCA1 following deoxyribonucleic acid damage. *Cancer Res* **60**: 5037-5039.

Chen Y, Farmer AA, Chen CF, Jones DC, Chen PL, Lee WH (1996). BRCA1 is a 220kDa nuclear phosphoprotein that is expressed and phosphorylated in a cell-cycle manner. *Cancer Res* **56**: 3168-3172.

Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW Jr, Leahy DJ (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* **421**:756-760.

Cho ZH, Chan JK, Ericksson L, Singh M, Graham S, MacDonald NS, Yano Y (1975). Positron ranges obtained from biomedically important positron-emitting radionuclides. *J Nucl Med* **16(12)**:1174-1176.

Chung JK, Kim YK, Kim S, Lee YJ, Paek S, Yeo JS, Jeong JM, Lee DS, Jung HW, Lee MC (2002). Usefulness of ¹¹C-methionine PET in the evaluation of brain lesions that are hypo- or isometabolic on 18F-FDG PET. *Eur J Nucl Med* **29**:176-182.

Clarke RB, Anderson E, Howell A (2004). Steroid receptors in human breast cancer. *Trends Endocrinol Metab* **15(7)**:316-323.

Clark M (2006). Meta-analyses of adjuvant therapies for women with early breast cancer: the Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group overview. *Annals of Oncology* **17(suppl 10)**:x59-x62.

Conte FA, Grumbach MM, Ito Y, Simpson ER (1994). A syndrome of female pseudohermaphroditism, hypergonadotropic hypogonadism, and multikystic ovaries associated with missense mutation in the gene encoding aromatase (P450arom). *J Clin Endocrinol Metab*.**78**:1287-1292.

Cortez D, Wang Y, Qin J, Elledge SJ (1999). Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* **286**: 1162-1166.

Crippa F, Seregini E, Agresti R, Chiesa C, Pascali C, Bogni A, Decise D, De Sanctis V, Greco M, Daidone MG, Bombardieri E (1998). Association between [¹⁸F]-fluorodeoxyglucose uptake and postoperative histopathology, hormone receptor status, thymidine labelling index and p53 in primary breast cancer: a preliminary observation. *Eur J Nucl Med* **25**:1429-1434.

Dati C, Antoniotti S, Taverna D, Perroteau I, De Bortoli M (1990). Inhibition of c-erbB-2 oncogene expression by estrogens in human breast cancer cells. *Oncogene* **5**:1001-1006.

Davoli A, Hocevar BA, Brown TL (2010). Progression and treatment of HER2-positive breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **65**:611-623.

Dehdashti F, Flanagan FL, Mortimer JE, Katzenellenbogen JA, Welch MJ, Siegel BA (1999). Positron emission tomographic assessment of "metabolic flare" to predict response of metastatic breast cancer to antiestrogen therapy. *Eur. J Nucl Med* **26(1)**:51-56.

Dehdashti F, Mortimer JE, Siegel BA, Griffeth LK, Bonasera TJ, Fusselman MJ, Detert DD, Cutler PD, Katzenellenbogen JA, Welch MJ (1995). Positron tomographic assessment of estrogen receptors in breast cancer: comparison with FDG-PET and in vitro receptor assays. *J Nucl Med* **36**: 1766-74.

DiRenzo J, Shang Y, Phelan M, Sif S, Myers M, Kingston R, Brown M (2000). BRG-1 is recruited to estrogen-responsive promoters and cooperates with factors involved in histone acetylation. *Mol Cell Biol* **20**: 7541-7549.

Driscoll MD, Sathya G, Muyan M, Klinge CM, Hilf R, Bambara RA (1998). Sequence requirements for estrogen receptor binding to estrogen response elements. *J Biol Chem* **273(45)**: 29321-29330.

Dukes M, Waterton JC, Wakeling AE (1993). Antiuterotrophic effects of the pure antiestrogen ICI 182,780 in adult female monkeys (*Macaca nemestrina*): quantitative magnetic resonance imaging. *J Endocrinol* **138**:203-209.

Early Breast Cancer Trialist Collaborative Group (1992). Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy: 133 randomized trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. *Lancet* **339**:1-15.

Early Breast Cancer Trialist Collaborative Group (1998). Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomized trials. *Lancet* **351**:1451-1467.

Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group (EBCTCG) (2005). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* **365**:1687-1717.

Easton DF, Ford D, Bishop DT (1995). Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. *Am J Hum Genet* **56**:265-271.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschli T (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**:494-498.

Ellims PH, van der Weyden MB, Medley G (1981). Thymidine kinase isoenzymes in human malignant lymphoma. *Cancer Res*, **41**: 691-695.

Ellis M (2004). Overcoming endocrine therapy resistance by signal transduction inhibition. *Oncologist* **9**:20-26.

Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA (1997). Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* **82**: 4258-4265.

Fabris V, Lamb CA, Keck C, Aldaz MC, Merani S, Lanari C (2003). Karyotypic evolution of four novel mouse mammary carcinoma cell lines. Identification of marker chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* **142**:36-45.

Felgner PL, Barenholz Y, Behr JP, Cheng SH, Huang L, Jessee JA, Seymour L, Szoka F, Thierry AR, Wagner E, Wu G (1997). Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum Gene Ther* **8(5)**:511-512.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.

Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER (1998). Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:6965-6970.

Fitzpatrick LA (1999). Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens: new therapies for the post-menopausal women. *Mayo Clin Proc* **74**:601-607.

Foray N, Randrianarison V, Marot D, Perricaudet M, Lenoir G, Feunteun J (1999). γ -rays-induced death of human cells carrying mutations of BRCA1 or BRCA2. *Oncogene* **18**:7334-7342.

Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE (1994). Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *Lancet* **343**:692-695.

Foster PA, Chander SK, Newman SP, Woo LW, Sutcliffe OB, Bubert C, Zhou D, Chen S, Potter BV, Reed MJ, Purohit A (2008). A new therapeutic strategy against hormone-dependent breast cancer: the preclinical development of a dual aromatase and sulfatase inhibitor. *Clin Cancer Res* **14(20)**:6469-6477.

Geisler J, Haynes B, Anker G, Dowsett M, Lonning PE (2002). Influence of letrozole and anastrozole on total body aromatization and plasma estrogen levels in postmenopausal breast cancer patients evaluated in a randomized, cross-over study. *J Clin Oncol* **20**:751-757.

Gil J, Esteban M (2000). Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis* **5**:107-114.

Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE (1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* **16**:1647-1655.

Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* **320** :134-139

Grewal SIS (2010). RNAi-dependent formation of heterochromatin and its diverse functions. *Curr Opin Genet Dev* **20**:134-141.

Grierson JR, Shields AF, Eary JF (1997). Development of a radiosynthesis for 3'-[F-18]fluoro-3'-deoxynucleosides. *J Labeled Compounds Radiopharm* **40**:60-62.

Grierson JR, Schwartz JL, Muzi M, Jordan R, Krohn KA (2004). Metabolism of 3'-deoxy-3' -[F-18]fluorothymidine (FLT) in proliferating A549 cells: validations for positron emission tomography (PET). *Nucl Med Biol.***31**:829-837.

Gronemeyer H (1991). Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annu Rev Genet* **25**:89-123.

Gudas JM, Nguyen H, Li T, Cowan KH (1995). Hormone-dependent regulation of BRCA1 in human breast cancer cells. *Cancer Res* **55**:4561-4565.

Gylling H, Pyrhonen S, Mantyla E, Maenpaa H, Kangas L, Miettinen TA (1995). Tamoxifen and toremifene lower serum cholesterol by inhibition of D⁸-cholestenol conversion to lathostenol in women with breast cancer. *J Clin Oncol* **13**:2900-2905.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404(6775)**:293-296.

Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ (2001). Posttranscriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* **2**:110-119.

Hatakeyama T, Kawai N, Nishiyama Y, Yamamoto Y, Sasakawa Y, Ichikawa T, Tamiya T (2008). ¹¹C-methionine (MET) and ¹⁸F-fluorothymidine (FLT) PET in patients with newly diagnosed glioma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **35**:2009-2017.

Hashizume R, Fukuda M, Maeda I, Nishikawa H, Oyake D, Yabuki Y, Ogata H, Ohta T (2001). The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J Biol Chem* **276(18)**: 14537-14540.

Haynes C, Erlwein O, Schnierle BS (2003). Modified envelope glycoproteins to retarget retroviral vectors. *Curr Gene Ther* **3**:405-410.

Helmer F, Kiehs K, Hansch C (1968). The linear free-energy relationship between partition coefficients and the binding and conformational perturbation of macromolecules by small organic compounds. *Biochemistry* **7**:2858-2863.

Henderson IC, Patek AJ (1998). The relationship between prognostic and predictive factors in the management of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **52(1-3)**:261-288.

Higashi K, Clavo AC, Wahl RL (1993). Does FDG uptake measure proliferative activity of human cancer cells? In vitro comparison with DNA flow cytometry and tritiated thymidine uptake. *J Nucl Med* **34**:414-419.

Howell A (2006). Pure oestrogen antagonists for the treatment of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **13**:689-706.

Howell A, Osborne CK, Morris C, Wakeling AE (2000). ICI 182,780 (Faslodex): Development of a novel, pure antiestrogen. *Cancer*. **89(4)**:817-825.

Hryb DJ, Khan MS, Romas NA, Rosner W (1990). The control of the interaction of sex hormone-binding globulin with its receptor by steroid hormones. *J Biol Chem* **265(11)**:6048-6054.

Huse B, Verca SB, Matthey P, Rusconi S (1998). Definition of a negative modulation domain in the human progesterone receptor. *Mol Endocrinol* **12**:1334-1342.

Hutcheson IR, Knowlden JM, Madden TA, Barrow D, Gee JM, Wakeling AE, Nicholson RI (2003). Estrogen receptor-mediated modulation of the EGFR/MAPK pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. *Breast Cancer Research and Treatment* **81**:81-93.

Hyder SM, Chiappetta C, Stancel GM (1999). Interaction of human estrogen receptors α and β with the same naturally occurring estrogen response elements. *Biochem Pharmacol* **57**:597-601.

Inoue T, Kim EE, Wong FCL, Yang DJ, Bassa P, Wong WH, Korkmaz M, Tansey W, Hicks K, Podoloff DA (1996). Comparison of fluorine-18-fluorodeoxyglucose and carbon-11-methionine PET in detection of malignant tumors. *J Nucl Med* **37**:1472-1476.

Jager PL, Vaalburg W, Pruim J, de Vries EGE, Langen KJ, Piers DA (2001). Radiolabeled aminoacids : basic aspects and clinical applications in oncology. *J Nucl Med* **42**:432-445.

Jensen EV (1966). Mechanism of estrogen action in relation to carcinogenesis. *Proc Can Cancer Conf* **6**:143-165.

Johnston SJ, Cheung KL (2010). Fulvestrant - a novel endocrine therapy for breast cancer. *Curr Med Chem* **17(10)**:902-914.

Johnston SR, Sacconi-Jotti G, Smith IE, Salter J, Newby J, Coppen M, Ebbs SR, Dowsett M (1995). Changes in estrogen receptor, progesterone receptor, and pS2 expression in tamoxifen-resistant human breast cancer. *Cancer Res* **55**:3331-3338.

Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Wreford NG, Proietto J, Oz OK, Leury BJ, Robertson KM, Yao S, Simpson ER (2000). Aromatase-deficient (ARKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci USA* **97(23)**:12735-12740.

Jones FE, Stern DF (1999). Expression of dominant-negative ErbB2 in the mammary gland of transgenic mice reveals a role in lobuloalveolar development and lactation. *Oncogene* **18**:3481-3490.

Jordan VC, Allen KE (1980). Evaluation of the antitumour activity of the non-steroidal antioestrogen monohydroxytamoxifen in the DMBA induced rat mammary carcinoma model. *Eur J Cancer* **16**:239-251.

Jordan VC, Collins MM, Rowsby L, Prestwich G (1977). A monohydroxylated metabolite of tamoxifen with potent antioestrogenic activity. *J Endocrinol* **75**: 305-316.

Jorgensen R (1990). Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. *Trends Biotechnol* **8**:340-344.

Kalaitzidis D, Gilmore TD (2005). Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NFκB. *Trends in Endocrinology and Metabolism*; **16(2)**:46-52.

Kastner, P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *Embo J* **9**:1603-1614.

Kiesewetter D, Katzenellenbogen J, Kilbourn M, Welch M (1984). Fluorine-18 labeled estrogen: stereochemical and radiochemical considerations in the preparation of fluorine-18 labeled 16-fluoro estrogens by fluoride ion displacement reactions. *J Org Chem* **49**: 4900-4905.

Klein-Hitpass L, Ryffel GU, Heitlinger E, Cato ACB (1988). A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucl Acid Res* **16(2)**: 647-663.

Kong XB, Zhu QY, Vidal PM, Watanabe KA, Polsky B, Armstrong D, Ostrander M, Lang SA Jr, Muchmore E, Chou TC (1992). Comparison of anti-human immunodeficiency virus activities, cellular transport, and plasma and intracellular pharmacokinetics of 3'-fluoro-3'-deoxythymidine and 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Antimicrob Agents Chemother* **36**: 808-818.

Kraus WL, Montano MM, Katzenellenbogen BS (1993). Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol Endocrinol* **7**:1603-1616.

Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* **139(10)**: 4252-4263.

Kumar P, Mercer J, Doerkson C, Tonkin K, McEwan AJB (2007). Clinical production, stability studies and PET imaging with 16α -[^{18}F]-fluoroestradiol ([^{18}F]FES) in ER positive breast cancer patients. *J Pharm Pharmaceut Sci* **10(2)**:256S-265S.

Kumar P, Wu Q, Chambliss KL, Yuhanna IS, Mumby SM, Mineo C, Tall GG, Shaul PW (2007). Direct interactions with $G\alpha i$ and $G\beta\gamma$ mediate nongenomic signaling by estrogen receptor α . *Mol Endocrinol* **21**: 1370-1380.

Kumar R, (2007). Targetted functional imaging in breast cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **34**: 346-353.

Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin J.R, Chambon P (1987). Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* **51(6)**: 941-951.

Lanari C, Lüthi I, Lamb CA, Fabris V, Pagano E, Helguero LA, Sanjuan N, Merani S, Molinolo AA (2001). Five novel hormone-responsive cell lines derived from murine mammary ductal carcinomas: *in vivo* and *in vitro* effects of estrogens and progestins. *Can Res* **61**:293-302.

Langen P, Etzold G, Hintsche R, Kowollik G (1969). 3'-Deoxy-3'-fluorothymidine, a new selective inhibitor of DNA-synthesis. *Acta Biol Med Ger*, **23**: 759-766.

Langer G, Bader B, Meoli L, Isensee J, Delbeck M, Noppinger P.R, Otto C (2010). A critical review of fundamental controversies in the field of GPR30 research. *Steroids* **75(8-9)**: 603-610.

Lapidus RG, Nass SJ, Davidson NE (1998). The loss of estrogen and progesterone receptor gene expression in human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **3(1)**: 85-94.

Lee JS, Collins KM, Brown AL, Lee CH, Chung JH (2000). hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature* **404**:201-204.

Lee KF, Simon H, Chen H, Bates B, Hung MC, Hauser C (1995). Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* **378(6555)**:394-8.

Lee TS, Ahn SH, Moon BS, Chun KS, Kang JH, Cheon GJ, Choi CW, Lim SM (2009). Comparison of ¹⁸F-FDG, ¹⁸F-FET and ¹⁸F-FLT for differentiation between tumor and inflammation in rats. *Nucl Med Biol* **36**:681-686.

Lerner LJ (1964). More antagonists: inhibitors of specific activities of estrogen and androgen. *Recent Prog Horm Res* **20**:435-490.

Leskinen-Kallio S, Nagren K, Lehikoinen P, Ruotsalainen U, Joensuu H (1991). Uptake of ¹¹C-methionine in breast cancer studied by PET. An association with the size of S-phase fraction. *Br J Cancer* **64**:1121-1124.

Levin CS, Hoffman EJ (1999). Calculation of positron range and its effect on the fundamental limit of positron emission tomography system spatial resolution. *Phys Med Biol* **44**: 781-799.

Levin ER (2009). G Protein-Coupled Receptor 30: Estrogen Receptor or Collaborator? *Endocrinology* **150(4)**:1563-1565.

Linden HM, Kurland BF, Peterson LM, Schubert EK, Gralow JR, Specht JM, Ellis GK, Lawton TJ, Livingston RB, Petra PH, Link JM, Krohn KA, Mankoff DA (2011). Fluoroestradiol positron emission tomography reveals differences in pharmacodynamics of aromatase inhibitors, tamoxifen and fulvestrant in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* **17(14)**: 4799-4805.

Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **305(5689)**:1437-1441.

Loman N, Johannsson O, Bendahl PO, Borg A, Ferno M, Olsson H (1998). Steroid receptors in hereditary breast carcinomas associated with BRCA1 or BRCA2 mutations or unknown susceptibility genes. *Cancer* **83**:310-319.

Lønning PE, Geisler J (2008). Indications and limitations of third-generation aromatase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* **17(5)**: 723-739.

Love RR, Wiebe DA, Feyzi JM, Newcomb PA, Chapell RJ (1995). Effects of tamoxifen on cardiovascular risk factors in postmenopausal women after 5 years of treatment. *J Natl Cancer Inst* **86**:1534-1539.

Loven MA, Likhite VS, Choi I, Nardulli AM (2001). Estrogen response elements alter coactivator recruitment through allosteric modulation of estrogen receptor β conformation. *J Biol Chem* **276**:45282-45288.

Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**(23):11162-11166.

Mackay A, Urruticoechea A, Dixon JM, Dexter T, Fenwick K, Ashworth A, Drury S, Larionov A, Young O, White S, Miller WR, Evans DB, Dowsett M (2007). Molecular response to aromatase inhibitor treatment in primary breast cancer. *Breast Cancer Res* **9**:R37.

Manjunath N, Wu H, Subramanya S, Shankar P (2009). Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. *Adv Drug Deliv Rev* **61**(9):732-745.

Manke IA, Lowery DM, Nguyen A, Yaffe MB (2003). BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. *Science* **302**(5645):636-639.

Mankoff DA, Tewson TJ, Eary JF (1997). Analysis of blood clearance and labeled metabolites for the estrogen receptor tracer [F-18]-16 α -fluoroestradiol (FES). *Nucl Med Biol* **24**:341-348 .

Marquis ST, Rajan JV, Wynshaw-Boris A, Xu J, Yin GY, Abel KJ, Weber BL, Chodosh LA (1995). The developmental pattern of Brca1 expression implies a role in differentiation of the breast and other tissues. *Nat Genet* **11**:17-26.

Massarweh S, Osborne CK, Jiang S, Wakeling AE, Rimawi M, Mohsin SK, Hilsenbeck S, Schiff R (2006). Mechanisms of tumor regression and resistance to estrogen deprivation and fulvestrant in a model of estrogen receptor-positive, HER-2/neu-positive breast cancer. *Cancer Res* **66**(16): 8266-8273.

Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL (1997). Aberrant glycolytic metabolism of cancer cells: A remarkable coordination of genetic, transcriptional, post-translational, and mutational events that lead to a critical role for type II hexokinase. *J Bioenerg Biomembr* **29**:339-343.

Matskevich AA, Moelling K (2007). Dicer is involved in protection against influenza A virus infection. *J Gen Virol* **88**(Pt 10):2627-2635.

Matthews J, Wihlén B, Tujague M, Wan J, Ström A, Gustafsson JA (2006). Estrogen receptor (ER) β modulates ER α -mediated transcriptional activation by altering the recruitment of c-Fos and c-Jun to estrogen-responsive promoters. *Mol Endocrinol* **20**:534-543.

McClelland RA, Barrow D, Madden TA, Dutkowski CM, Pamment J, Knowlden JM, Gee JM, Nicholson RI (2001). Enhanced epidermal growth factor receptor signaling in MCF-7 breast cancer cells after long-term culture in the presence of the pure antiestrogen ICI182 780 (Faslodex). *Endocrinology* **142**:2776-2788.

McDonnell DP, Clemm DL, Hermann T, Goldman ME, Pike JW (1995). Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. *Molecular Endocrinology* **9**:659-669.

McGuire AH, Dehdashti F, Siegel BA, Lyss AP, Brodack JW, Mathias CJ, Mintun MA, Katzenellenbogen JA, Welch MJ (1991). Positron tomographic assessment of 16α -[^{18}F]-Fluoro- 17β -estradiol uptake in metastatic breast carcinoma. *J Nucl Med* **32**:1526-1531.

McManus MT, Haines BB, Dillon CP, Whitehurst CE, van Parijs, Chen J, Sharp PA (2002). Small interfering RNA-mediated gene silencing in T lymphocytes. *J immunol* **169(10)**:5754-5760.

Miller VM, Gouvion CM, Davidson BL, Paulson HL (2004). Targeting Alzheimer's disease genes with RNA interference: an efficient strategy for silencing mutant alleles. *Nucl Acid Res* **32(2)**:661-668.

Miller WR, Larionov A (2011). Molecular effects of oestrogen deprivation in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* **340**:127-136.

Miller WR, Larionov A, Renshaw L, Anderson TJ, White S, Murray J, Murray E, Hampton G, Walker JR, Ho S, Krause A, Evans DB, Dixon JM (2007). Changes in breast cancer transcriptional profiles after treatment with the aromatase inhibitor, letrozole. *Pharmacogenet Genomics* **17**:813-826.

Mintun MA, Welch MJ, Siegel BA, Mathias CJ, Brodack JW, McGuire MH, Katzenellenbogen JA (1988). Breast cancer: PET imaging of estrogen receptors. *Radiology* **169(1)** :45-48.

Miyazawa H, Arai T, Iio M, Hara T (1993). PET imaging of non-small-cell lung carcinoma with carbon-11-methionine: relationship between radioactivity uptake and flow cytometric parameters. *J Nucl Med* **34**:1886-1891.

Moasser MM (2007). The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its roles in human cancer pathogenesis. *Oncogene* **26**: 6469-6487.

Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin M (1995). Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of oestrogens. *J Clin Endocrinol Metab* **80**:3689-3698.

Mortimer JE, Dehdashti F, Siegel BA, Katzenellenbogen JA, Fracasso P, Welch MJ (1996). Positron emission tomography with 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-D-glucose and 16 α -[¹⁸F]fluoro-17 β -Estradiol in breast cancer: correlation with estrogen receptor status and response to systemic therapy. *Clin Can Res* **2**: 933-939.

Mosselman S, Polman J, Dijkema R (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* **392**: 49-53.

Mote PA, Arnett-Mansfield RL, Gava N, deFazio A, Mulak-Jericevic B, Conneely OM, Clarke CL (2006). Overlapping and distinct expression of progesterone receptors A and B in mouse uterus and mammary gland during the estrous cycle. *Endocrinology* **147**(12):5503-5512.

Mote PA, Balleine RL, McGowan EM, Clarke CL (1999). Colocalization of progesterone receptors A and B by dual immunofluorescent histochemistry in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* **84**: 2963-2971.

Mote PA, Bartow S, Tran N, Clarke CL (2002). Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* **72**:163-172.

Mueller MD, Vigne J-L, Minchenko A, Lebovic DI, Leitman DC, Taylor RN (2000). Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors α and β . *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:10972-10977.

Mulac-Jericevic B, Lydon JP, DeMayo FJ, Conneely OM (2003). Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:9744-9749.

Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP, Conneely OM (2000). Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* **289**:1751-1754.

Munch-Petersen B, Cloos L, Tyrsted G, Eriksson S (1991). Diverging substrate specificity of pure human thymidine kinases 1 and 2 against antiviral dideoxynucleosides. *J Biol Chem* **266**:9032-9038.

Nachar O, Rousseau JA, Lefebvre B, Ouellet R, Ali H, van Lier JE (1999). Biodistribution, Dosimetry and Metabolism of 11 β -Methoxy-(17 α ,20E/Z)-[¹²³I]iodovinylestradiol in Healthy Women and Breast Cancer Patients. *J Nucl Med* **40**:1728-1736.

Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJ Jr, Sledge GW Jr (1997). Constitutive activation of NF- κ B during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol Cell Biol* **17**: 3629-3639.

Nicholson RI, Staka C, Boyns F, Hutcheson IR & Gee JM (2004). Growth factor-driven mechanisms associated with resistance to estrogen deprivation in breast cancer: new opportunities for therapy. *Endocrine-Related Cancer* **11**:623-641.

Nottebrock H, Then R (1977). Thymidine concentrations in serum and urine of different animal species and man. *Biochem Pharmacol* **26**:2175-2179.

Obbard DJ, Gordon KHJ, Buck AH, Jiggins FM (2009). The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Phil Trans R Soc B* **364**:99-115.

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo J* **19**(13):3159-3167.

O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U (2004). Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol. Endocrinol.* **18** (8): 1859-1875.

Osborne CK (1998). Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat* **51**(3):227-238.

Osborne CK, Pippen J, Jones SE, Parker LM, Ellis M, Come S, Gertler SZ, May JT, Burton G, Dimery I, Webster A, Morris C, Elledge R, Buzdar A (2002). Double-blind, randomized trial comparing the efficacy and tolerability of fulvestrant versus anastrozole in postmenopausal women with advanced breast cancer progressing on prior endocrine therapy: results of a North American trial. *J Clin Oncol* **20**:3386-3395.

Oz OK, Zerwekh JE, Fisher C, Graves K, Nanu L, Millsaps R, Simpson ER (2000). Bone has a sexually dimorphic response to aromatase deficiency. *J Bone Miner Res* **15**(3):507-514.

Pedram A, Razandi M, Levin ER (2006). Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol Endocrinol* **20**: 1996-2006.

Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* **16**(8):948-958.

Paquette M, É Lavallée, Langlois R, Croteau É, Guérin B, Bénard F, van Lier JE, Lecomte R, Turcotte É (2012). Preliminary results of a phase II trial comparing

4FMFES to FES in PET imaging of breast cancer patients. *World Molecular Imaging Congress (WMIC 2012)*, Dublin, Irlande 5-8 septembre 2012, P896.

Paquette M, É Lavallée, Langlois R, Phoenix S, Ouellet R, van Lier JE, Bénard F, Turcotte É, Lecomte R (2012). 4FMFES and FES PET imaging from mice to human: different metabolism, different results. *World Molecular Imaging Congress (WMIC 2012)*, Dublin, Irlande 5-8 septembre 2012, P875.

Parker MG (1993). Action of "pure" antiestrogens in inhibiting estrogen receptor action. *Breast Cancer Res Treat* **26(2)**:131-137.

Pasquinelli AE, Ruvkun G (2002). Control of developmental timing by micro-RNAs and their targets. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**:495-513.

Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* **10**: 886-895.

Pauwels EK, Ribeiro MJ, Stoot JH, McCreedy VR, Bourguignon M, Mazière B (1998). FDG accumulation and tumor biology. *Nucl Med Biol* **25**:317-322.

Perey L, Paridaens R, Hawle H, Zaman K, Nolé F, Wildiers H, Fiche M, Dietrich D, Clément P, Köberle D, Goldhirsch A, Thürlimann B (2007). Clinical benefit of fulvestrant in postmenopausal women with advanced breast cancer and primary or acquired resistance to aromatase inhibitors: final results of phase II Swiss Group for Clinical Cancer Research Trial (SAKK 21/00). *Ann Oncol* **18**:64-69.

Peterson LM, Kurland BF, Linka JM, Schubert MK, Stekhova S, Linden HM, Mankoff DA (2011). Factors influencing the uptake of 18F-fluoroestradiol in patients with estrogen receptor positive breast cancer. *Nucl Med Biol* **38**:969-978.

Phelps ME, Hoffman EJ, Huang SC, Ter-Pogossian MM (1975). Effect of positron range on spatial resolution. *J Nucl Med* **16(7)**:649-652.

Phelps ME, Huang SC, Hoffman EJ, Selin C, Sokoloff L, Kuhl DE (1979). Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (F-18)2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: validation of method. *Ann Neurol* **6**:371-388.

Pomper MG, VanBrocklin H, Thieme AM, Thomas RD, Kiesewetter DO, Carlson KE, Mathias CJ, Welch MJ, Katzenellenbogen JA (1990). 11 beta-methoxy-, 11 beta-ethyl- and 17 alpha-ethynyl-substituted 16 alpha-fluoroestradiols: receptor-based imaging agents with enhanced uptake efficiency and selectivity. *J Med Chem* **33(12)**:3143-3155.

Rasey JS, Grierson JR, Wiens LW, Kolb PD, Schwartz JL (2002). Validation of FLT uptake as a measure of thymidine kinase-1 activity in A549 carcinoma cells. *J Nucl Med* **43**:1210-1217.

Razandi M, Alton G, Pedram A, Ghonshani S, Webb D, Levin ER (2003). Identification of a structural determinant for the membrane localization of ER. *Mol Cell Biol* **23**: 1633-1646.

Razandi M, Pedram A, Merchenthaler I, Greene GL, Levin ER (2004). Plasma membrane estrogen receptors exist and function as dimers. *Mol Endocrinol* **18**: 2854-2865.

Rolph KL, Harrington KJ, Pandha H (2005). Adenoviral strategies for the gene therapy of cancer. *Semin Oncol* **32**:573-582.

Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* **307**:1625-1630.

Riemsma R, Forbes CA, Kessels A, Lykopoulos K, Amonkar MM, Rea DW, Kleijnen J (2010). Systematic review of aromatase inhibitors in the first-line treatment of hormone sensitive advanced or metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **123**:9-24.

Romano N, Macino G (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol* **6**:3343-3353.

Rozema DB, Lewis DL (2003). siRNA delivery technologies for mammalian systems. *Targets* **2(6)**:253-260.

Rutz S, Scheffold A (2004). Towards *in vivo* application of RNA interference - new toys, old problems. *Arthritis Res Ther* **6(2)**:78-85.

Sabnis G, Schayowitz A, Goloubeva O, Macedo L, Brodie A (2009). Trastuzumab reverses letrozole resistance and amplifies the sensitivity of breast cancer cells to estrogen. *Cancer Res* **69(4)**:1416-28.

Saier MH Jr, Daniels GA, Boerner P, Lin J (1988). Neutral amino acid transport systems in animal cells: potential targets of oncogene action and regulators of cellular growth. *J Membr Biol* **104**:1-20.

Sato N, Suzuki M, Kuwata N, Kuroda K, Wada T, Beppu T, Sera K, Sasaki T, Ogawa A (1999). Evaluation of the malignancy of glioma using 11C-methionine positron emission tomography and proliferating cell nuclear antigen staining. *Neurosurg Rev* **22**:210-214.

Schiff R, Massarweh S, Shou J, Bharwani L, Mohsin SK, Osborne CK (2004). Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. *Clin Cancer Res* **10**:331-336S.

Schiff R, Massarweh S, Shou J, Osborne CK (2003). Breast cancer endocrine resistance: how growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response. *Clin Cancer Res* **9**:447-454S.

Schneider W, Ramachandran C, Satyaswaroop PG, Shyamala G (1991). Murine progesterone receptor exists predominantly as the 83-kilodalton "A" form. *J Steroid Biochem Mol Biol* **38**:285-291.

Scott REM, Wu-Peng XS, Yen PM, Chin WW, Pfaff DW (1997). Interactions of estrogen- and thyroid hormone receptors on a progesterone receptor estrogen response element (ERE) sequence: a comparison with the vitellogenin A2 consensus ERE. *Mol Endocrinol* **11**: 1581-1592.

Seimbille Y, Ali H, van Lier JE (2002). Synthesis of 2,16 α - and 4,16 α -difluoroestradiols and their 11 β -methoxy derivatives as potential estrogen receptor-binding radiopharmaceuticals. *J Chem Soc Perkin Trans 1* **5**:657-663.

Seimbille Y, Rousseau J, Bénard F, Ali H, van Lier JE (2001). Synthesis of 2,16 α - and 4,16 α -[16 α -18F]difluoroestradiols and their 11 β -methoxy derivatives for estrogen receptor imaging. *J Labelled Cpd Radiopharm* **44**:S348-S350.

Seimbille Y, Rousseau J, Bénard F, Morin C, Ali H, Avvakumov G, Hammond GL, van Lier JE (2002). ¹⁸F-labeled difluoroestradiols: preparation and preclinical evaluation as estrogen receptor-binding radiopharmaceuticals. *Steroids* **67**: 765-775.

Sherley JL, Kelly TJ (1988). Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. *J Biol Chem* **263**: 8350-8358.

Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* **95**:927-937.

Shotwell A, Jayme DW, Killberg M, Oxender DL (1981). Neutral amino acid transport systems in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **256**:5422-5427.

Siegel PM, Ryan ED, Cardiff RD, Muller WJ (1999). Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer. *EMBO J* **18**: 2149-2164.

Simoncini T, Maffei S, Basta G, Barsacchi G, Genazzani AR, Liao J.K, De Caterina R (2000). Estrogens and glucocorticoids inhibit endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by different transcriptional mechanisms. *Circ Res* **87**: 19-25.

Simpson ER, Misso M, Hewitt KN, Hill RA, Boon WC, Jones ME, Kovacic A, Zhou J, Clyne CD (2005). Estrogen-the good, the bad and the unexpected. *Endocr Rev* **26(3)**:322-330.

Sinha S, Kasetta J, Santner SJ, Demers LM, Bremmer WJ, Santen RJ (1998). Effect of CGS 20267 on ovarian aromatase and gonadotropin levels in the rat. *Breast Cancer Res Treat* **48**:45-51.

Skloris GP, Munot K, Bell SM, Carder PJ, Lane S, Horgan K, Lansdown MR, Parkes AT, Hanby AM, Markham AF, Speirs V (2003). Reduced expression of oestrogen receptor beta in invasive breast cancer and its reexpression using DNA methyl transferase inhibitors in a cell line model. *J Pathol* **201**:213-220.

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, *et al.* (1989). Studies of the HER-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244**:707-712.

Sliva K, Schnierle BS (2010). Selective gene silencing by viral delivery of short hairpin RNA. *Virol J* **7(248)**:1-11.

Sliwkowski MX (2003). Ready to partner. *Nat Struct Biol* **10**:158-159.

Sluysers M, Rijkers AWM, De Goeij CCJ, Parker M, Hilkens J (1988). Assignment of estradiol receptor gene to mouse chromosome 10. *J Steroid Biochem* **31(5)**:757-761.

Smith TA, 1998. FDG uptake, tumour characteristics and response to therapy, a review. *Nucl Med Commun* **19**:97-105.

Smith TA (2001). The rate-limiting step for tumor [¹⁸F]fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) incorporation. *Nucl Med Biol* **28**:1-4.

Solit DB, Santos E, Pratilas CA, Lobo J, Moroz M, Cai S, Blasberg R, Sebolt-Leopold J, Larson S, Rosen N (2007). 3'-deoxy-3'-[¹⁸F]fluorothymidine positron emission tomography is a sensitive method for imaging the response of BRAF-dependent tumors to MEK inhibition. *Can Res* **67(23)**:11463-11469.

Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC Slicer activity. *Science* **305(5689)**:1434-1437.

Souba WW, Pacitti AJ (1992). How amino acids get into cells: mechanisms, models, menus and mediators. *J Parenter Enteral Nutr* **16**:569-578.

Speirs V, Carder PJ, Lane S, Dodwell D, Lansdown MR, Hanby AM (2004). Oestrogen receptor [beta]: what it means for patients with breast cancer. *The Lancet Oncology* **5(3)**:174-181.

Strel'chyonok OA, Avvakumov GV (1990). Specific steroid-binding glycoproteins of human blood plasma: novel data on their structure and function. *J Steroid Biochem* **35(5)**:519-534.

Sung VMH, Lai MMC (2002). Murine retroviral pseudotype virus containing hepatitis B virus large and small surface antigens confers specific tropism for primary human hepatocytes: a potential liver-specific targeting system. *J Virol* **76(2)**:912-917.

Tait JF, Tait SA (1991). The effect of plasma protein binding on the metabolism of steroid hormones. *J Endocrinol* **131(3)**:339-357.

Thasni KA, Rakesh S, Rojini G, Ratheeshkumar T, Srinivas G, Priya S (2008). Estrogen-dependent cell signaling and apoptosis in BRCA1-blocked BG1 ovarian cancer cells in response to plumbagin and other chemotherapeutic agents. *Ann Oncol* **19**:696-705.

Tomari Y, Matranga C, Haley B, Martinez N, Zamore PD (2004). A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* **306**:1377-1380.

Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguère V (1997). Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol* **11**:353-365.

Tseng JR, Dandekar M, Subbarayan M, Cheng Z, Park JM, Louie S, Gambhir SS (2005). Reproducibility of 3'-deoxy-3'-¹⁸F-fluorothymidine microPET studies in tumor xenografts in mice. *J Nucl Med* **46**:1851-1857.

Tsuda H (2001). Prognostic and predictive value of c-erbB-2 (HER-2/neu) gene amplification in human breast cancer. *Breast Cancer* **8**:38-44.

Tsujikawa T, Yoshida Y, Kiyono Y, Kurokawa T, Kudo T, Fujibayashi Y, Kotsuji F, Okazawa H (2009). Functional oestrogen receptor α imaging in endometrial carcinoma using 16 α -[¹⁸F]-fluoro-17 β -estradiol PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **38**:37-45.

Tsujikawa T, Yoshida Y, Kudo T, Kiyono Y, Kurokawa T, Kobayashi M, Tsuchida T, Fujibayashi Y, Kotsuji F, Okazawa H (2009). Functional images reflect aggressiveness of endometrial carcinoma: estrogen receptor expression combined with 18F-FDG PET. *J Nucl Med* **50(10)**:1598-1604.

Turcotte E, Paquette M, Lavallée E, Langlois R, Croteau E, Dubreuil S, Senta H, Lecomte R, Guerin B, Benard F, Van Lier JE (2012). Comparison of 4FMFES-PET

with FES-PET in a phase-II trial to detect estrogen receptor-positive breast cancer: preliminary results. *59th Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine*, Miami, Florida, 9-13 juin 2012 (*Journal of Nuclear Medicine*, **53** (suppl. 1), mai 2012).

VanBrocklin HF, Carlson KE, Katzenellenbogen JA, Welch MJ (1993). 16β -([^{18}F]Fluoro)estrogens: Systematic investigation of a new series of fluorine-18-labeled estrogens as potential imaging agents for estrogen-receptor-positive breast tumors. *J Med Chem* **36**: 1619-1629.

Van Themsche C, Parent S, Leblanc V, Descôteaux C, Simard AM, Bérubé G, Asselin E (2009). VP-128, a novel oestradiol-platinum(II) hybrid with selective anti-tumour activity towards hormone-dependent breast cancer cells *in vivo*. *Endocr Relat Cancer* **16**(4):1185-1195.

Van Waarde A, Cobben DCP, Suurmeijer AJH, Maas B, Vaalburg W, de Vries EFJ, Jager PL, Hoekstra HJ, Elsinga PH (2004). Selectivity of ^{18}F FLT and ^{18}F FDG for differentiating tumor from inflammation in a rodent model. *J Nucl Med* **45**:695-700.

Venkitaraman AR (2002). Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* **108**: 171-182.

Verdel A, Jia S, Gerber S, Sugiyama T, Gygi S, Grewal SIS, Moazed D (2004). RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* **303**(5658):672-676.

Vesselle H, Grierson J, Muzi M, Pugsley JM, Schimdt RA, Rabinowitz P, Peterson LM, Vallières E, Wood DE (2002). *In vivo* validation of 3'-deoxy-3'-[^{18}F]fluorothymidine ([^{18}F]FLT) as a proliferation imaging tracer in humans: correlation of [^{18}F]FLT uptake by positron emission tomography with Ki-67 immunohistochemistry and flow cytometry in human lung tumors. *Clin Cancer Res* **8**:3315-3323.

Viertl D, Delaloye AB, Lanz B, Poitry-Yamate C, Gruetter R, Mlynarik V, Ametamey SM, Ross TL, Lehr HA, André PA, Perillo-Adamer F, Kosinsky M, Dupertuis YM, Buchegger F (2011). Increase of [^{18}F]FLT tumor uptake *in vivo* mediated by FdUrd: toward improving cell proliferation positron emission tomography. *Mol Imaging Biol* **13**: 321-331.

Vyhlidal C, Samudio I, Klädde MP, Safe S (2000). Transcriptional activation of transforming growth factor by estradiol: requirement for both a GC-rich site and an estrogen response element half-site. *J Mol Endocrinol* **24**:329-338.

Wakeling AE, Dukes M, Bowler J (1991). A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res* **51**:3867-3873.

Waring RH, Ayers S, Gescher AJ, Glatt HR, Meini W, Jarratt P, Kirk CJ, Pettitt T, Rea D, Harris RM (2008). Phytoestrogens and xenoestrogens: The contribution of diet and environment to endocrine disruption. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **108**:213-220.

Webb P, Nguyen P, Kushner PJ (2003). Differential SERM effects on corepressor binding dictate ERalpha activity in vivo. *J Biol Chem* **278(9)**:6912-6920.

Weber G (1977). Enzymology of cancer cells. *N Engl J Med* **296(9)**:486-492 et 541-551.

Weber G (2001). Ordered biochemical program of gene expression in cancer cells. *Biochemistry (Moscow)* **66(10)**:1164-1173.

Weiner DB, Liu J, Cohen JA, Williams WV, Greene MI (1989). A point mutation in the neu oncogene mimics ligand induction of receptor aggregation. *Nature* **339**:230-231.

Wijayarathne AL, McDonnell DP (2001). The human estrogen receptor-alpha is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators. *J Biol Chem* **276**:35684 - 35692.

Wiznerowicz M, Trono D (2005). Harnessing HIV for therapy, basic research and biotechnology. *Trends Biotechnol* **23**:42-47.

Yamamoto T, Seino Y, Fukumoto H, Koh G, Yano H, Inagaki N, Yamada Y., Inoue K, Manabe T Imura H (1990). Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **170**: 223-230.

Yamamoto Y, Nishiyama Y, Kimura N, Kameyama R, Kawai N, Hatakeyama T, Kaji M, Ohkawa M (2008). ¹¹C-acetate PET in the evaluation of brain glioma: comparison with ¹¹C-methionine and ¹⁸F-FDG-PET. *Mol Imaging Biol* **10**:281-287.

Yang YJ, Ryu JS, Kim SY, Oh SJ, Im KC, Lee H, Lee SW, Cho KJ, Cheon GJ, Moon DH (2006). Use of 3-deoxy-3'-I¹⁸F]fluorothymidine PET to monitor early responses to radiation therapy in murine SCCVII tumors. *EJNMMI* **33(4)**: 412-419.

Yarden RI, Lauber AH, El Ashry D, Chrysogelos SA (1996). Bimodal regulation of epidermal growth factor receptor by estrogen in breast cancer cells. *Endocrinology* **137**:2739-2747.

Yarden RI, Papa MZ (2006). BRCA1 at the crossroad of multiple cellular pathways: approaches for therapeutic interventions. *Mol Cancer Ther* **5(6)**: 1396-1404.

Yarden RI, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, Cowan KH, Brody LC (2002). BRCA1 regulates the G2-M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat Genet*: **30** : 285-289.

Yarden Y, Sliwkowski MX (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:127-137.

Yasui Y, Potter JD (1999). The shape of age-incidence curves of female breast cancer by hormone-receptor status. *Cancer Causes Control* **10(5)**:431-437.

Zielinski JE, Lerner JM, Hoffer PB, Hochberg RB (1989). The synthesis of 11 β -methoxy-16 α -[123I]iodoestradiol and its interaction with the estrogen receptor in vivo and in vitro. *J Nucl Med* **30**:209-215.

Zhou D, Zhou C, Chen S (1997). Gene regulation studies of aromatase expression in breast cancer and adipose stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **61**:273-80.