

Université de Sherbrooke

VALIDATION D'UN MODÈLE ANIMAL PAR IMAGERIE TEP DES
RÉCEPTEURS D'ŒSTROGÈNES MAMMAIRES TUMORAUX

Par Antonio Aliaga

Département de médecine nucléaire et de radiobiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du
grade de Maître ès Science (M.Sc.)

Septembre 2004



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-17263-6
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-17263-6

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma gratitude envers mes trois directeurs de recherche, Dr R. Lecomte, Dr F. Bénard et Dr J.E. van Lier. Je suis très reconnaissant envers Dr R. Lecomte pour la confiance qu'il m'a témoignée en me recrutant, mais aussi au Dr F. Bénard en me donnant l'opportunité de travailler sur son projet et pour son soutien et ses encouragements malgré les difficultés que nous avons rencontrées au début. Je voudrais finalement les remercier tous les deux pour leur support et leurs encouragements.

Je souhaite tout particulièrement remercier Jacques Rousseau, Jules Cadorette et Etienne Croteau pour leurs conseils, leur gentillesse et surtout pour la fidèle amitié que nous avons établie dans les dernières années. J'adresse aussi mes remerciements à mes collègues de travail qui ont coloré mon séjour. Merci à Véronique Bérard, Marie-Eve Gauthier et Mélanie Archambault.

Mes sincères remerciements vont également à René Ouellet et Serge Rodrigue pour la production des radiotraceurs et à Marcel Paquette pour la préparation des médicaments.

Je tiens aussi à remercier de tout mon cœur mes frères Oscar, Jesus, Arturo Aliaga et Isabel Salas pour leur soutien inconditionnel en m'encourageant depuis longtemps.

Enfin, je souhaite remercier les autres membres du jury, Dr J. DaSilva et Dr D. Hunting, pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Table des matières

Remerciements.....	i
Liste des publications.....	iv
Liste des abréviations.....	v
Liste des figures.....	vii
Résumé	
I. INTRODUCTION.....	1
1. CANCER DU SEIN	1
1.1 Origine du cancer du sein	1
1.2 Facteurs de risque	2
1.3 Prévention	5
1.4 Dépistage et diagnostic	6
2. ŒSTROGÈNES ET CANCER DU SEIN	7
2.1 Rôle des œstrogènes	7
2.2 Biosynthèse et métabolisme des œstrogènes	9
2.3 Récepteurs d'œstrogènes	11
2.4 Modulateurs sélectifs des récepteurs d'œstrogènes (MSRE).....	14
2.5 Œstrogènes et cancer du sein	16
2.6 Xénoœstrogènes.....	17
3. CHIMIOTHÉRAPIE ET HORMONOTHÉRAPIE DU CANCER DU SEIN.....	18
3.1 Agents cytotoxiques.....	18
3.1.1 Mécanisme d'action du méthotrèxate	20
3.1.2 Mécanisme d'action de la doxorubicine	21
3.2 Hormonothérapie	23
3.2.1 Mécanisme d'action du tamoxifène	24
3.2.2 Mécanisme d'action du raloxifène.....	25
3.2.3 Mécanisme d'action du létrozole	27
3.2.4 Mécanisme d'action de l'exémestane	28
4. MÉTHODES D'IMAGERIE UTILISÉES POUR LE DIAGNOSTIC DU CANCER DU SEIN.....	29
4.1 Mammographie.....	30
4.2 Scintigraphie	30
4.3 Tomographie d'émission par positrons (TEP).....	33
4.3.1 Radionucléides émetteurs de positrons.....	35
4.3.1.1) ¹⁸ F-Fluorodéoxyglucose (FDG).....	36
4.3.1.2) ^{16α} ¹⁸ F-fluoro-17β-estradiol (FES).....	38
5. IMAGERIE TEP ANIMALE	40
5.1 Description de la caméra TEP animale de l'Université de Sherbrooke	40
5.2 Étalonnage de la caméra TEP animale.....	42
5.2.1 Mires d'étalonnage	42

5.2.2 Définition du concept de valeurs de captation standardisées ou « Standardized Uptake Value » (SUV)	43
5.2.3 Évaluation des effets du volume partiel et de taux de comptage	44
5.3 Procédures relatives à l'analyse des images	48
5.4 Exemples d'application de l'imagerie TEP à haute résolution	48
II. ARTICLE I.....	52
III. ARTICLE II.....	86
IV. DISCUSSION.....	115
1. ÉNONCÉ DES RECHERCHES.....	116
2. ADÉNOCARCINOMES MAMMAIRES (Xénogreffes).....	117
3. CARCINOMES MAMMAIRES DE SOURIS.....	120
4. EFFET DE LA GLYCÉMIE ET DE LA THÉRAPIE SUR LA CAPTATION DU FDG.....	123
V. CONCLUSION.....	127
VI. ANNEXES	131
Annexe I	131
Annexe II.....	133
Annexe III	137
VII. RÉFÉRENCES	140

Liste des publications

Breast cancer models to study the expression of estrogen receptors with small animal PET imaging.

Antonio Aliaga, Jacques A. Rousseau, René Ouellette, Jules Cadorette, Johan E. van Lier, Roger Lecomte et Francois Bénard.

Nuclear Medicine and Biology vol. 31, no. 6, pp. 761-770, août 2004.

A small animal PET study of the effect of glycemia and therapy upon the uptake of FDG in breast cancer models.

Antonio Aliaga, Jacques A. Rousseau, Jules Cadorette, Étienne Croteau, Johan E. van Lier, Roger Lecomte et Francois Bénard.

Nuclear Medicine and Biology (Soumis en automne 2004).

Liste des abréviations

AF-1 / AF-2	Fonction d'activation de la transcription
AIB1	Amplified In Breast Cancer
BRCA1	BReast CAncer Gene1
BRCA2	BReast CAncer Gene2
CEA	« Carcinoma Embryonic Antigen », Antigène Carcino-embryogénique
Ch	Région charnière
CYP450	Cytochrome P450
DBD	DNA Binding Domain
DHFR	DiHydroFolate Réductase
DOX	Doxorubicine
ERE	Estrogen Response Element
EXE	Exémestane
E ₁	Œstrone
E ₂	Œstradiol
E ₃	Œstriol
FDG	¹⁸ F-Fluorodéoxyglucose
FES	16α-[¹⁸ F]fluoro-17β-estradiol
HER-2	Récepteur transmembranaire de facteur de croissance
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ICI 182,780	Imperial Chemical Industry (182,780)
keV	Kilo électron volts

LBD	Ligand Binding Domain
LET	Létrozole
MMP	Métalloprotéinase de la matrice cellulaire
MSRE	Modulateurs sélectifs des récepteurs d'œstrogènes
MTX	Méthotrèxate
MUC1	Mucine épithéliale polymorphique
RAL	Raloxifène
RE	Récepteurs d'œstrogènes
SHBG	Sex Hormone Binding Globulin
SUV	« Standardized Uptake Value », valeur de captation standardisée
TEM (SPECT)	Tomographie d'Émission Monophotonique (« Single Photon Emission Computed Tomography »)
TAG-72	Glycoprotéine antigénique tumorale 72
TAX	Tamoxifène
TEP	Tomographie d'Émission par Positrons
%DI/g	Pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu
2-OH-E ₂	2-hydroxyestradiol
4-OH-E ₂	4-hydroxyestradiol
16 α -OH-E ₂	16 α -hydroxyestradiol

Liste des figures

- Figure 1** Sein.
- Figure 2** Voies de biosynthèse des œstrogènes.
- Figure 3** Famille des œstrogènes.
- Figure 4** Structures des récepteurs d'œstrogène alpha et bêta chez l'humain.
- Figure 5** Structure chimique du tamoxifène et du raloxifène.
- Figure 6** Structures des composés (1) ICI 164384 et (2) ICI 182780.
- Figure 7** Mécanisme d'action du MTX et de la DOX.
- Figure 8** Traitements hormonaux divers du cancer du sein.
- Figure 9** Processus d'émission et de détection par TEP.
- Figure 10** Métabolisme de FDG.
- Figure 11** Mécanisme d'entrée du FES dans les cellules.
- Figure 12** Tomographe animale de l'Université de Sherbrooke.
- Figure 13** Comparaison entre les SUV_{max} et SUV_{mean} correspondant aux ROI 2D et 3D.
- Figure 14** Valeurs de SUV relatives aux mires avant (●) et après (○) correction pour le volume partiel. Moyenne des SUV corrigées (---).
- Figure 15** Effet du taux de comptage sur la réponse de la caméra, après correction du volume partiel.
- Figure 16** Corrélation entre différentes méthodes pour évaluer les SUV.
- Figure 17** Thérapie photodynamique en temps réel.

Figure 18 Images TEP au FDG, du ventricule gauche (VG) et droit (VD) prise une semaine après la ligature de l'artère coronaire gauche et coupes histologiques correspondantes.

Figure 19 Imagerie de tumeurs mammaires RE+ chez la souris. (A) accumulation de FDG, (B) capture du FES par le RE. Légende : L1 = MC7-L1; L2 = MC4-L2; C = cœur.

Résumé

Selon la Société canadienne du cancer (2004), une Canadienne sur neuf sera atteinte du cancer du sein au cours de sa vie et une sur vingt-sept en mourra. Et d'ici les dix prochaines années, le bilan risque de s'alourdir. En effet, on a observé que depuis le début des années 1980, l'incidence du cancer du sein a augmenté d'environ 25 %.

Le présent mémoire vise à apporter une contribution à la recherche dans la lutte contre le cancer du sein. Après un bref aperçu sur les causes et les facteurs de risque associés au cancer du sein, le mémoire s'attardera à étudier les outils de dépistage et de vérification de l'efficacité des traitements ayant cours.

Parmi les outils existants, nous avons privilégié la modalité d'imagerie appelée tomographie d'émission par positrons (TEP). Il s'agit d'un procédé non envahissant et très prometteur qui permet de visualiser divers paramètres tumoraux au niveau moléculaire. Par exemple dans les cancers du sein nous pouvons, par TEP, détecter et quantifier les récepteurs d'estrogène (RE) en utilisant un marqueur comme le 16α -[^{18}F]fluoro- 17β -estradiol (FES) qui se lie aux RE. De la même manière, le ^{18}F -Fluorodéoxyglucose (FDG) nous permet de visualiser l'activité métabolique des tumeurs et de détecter la présence de nécroses. La TEP fournit donc des informations importantes pour l'évaluation et le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

En outre la modalité d'imagerie TEP permet depuis peu d'étudier ces approches thérapeutiques *in vivo* sur modèle animal, ce qui facilite et accélère l'expérimentation et ouvre de nouvelles perspectives de recherche. Ainsi, une seule souris suffit pour évaluer plusieurs paramètres biochimiques de la tumeur *in vivo* et suivre un traitement du début à la fin, diminuant du même coup le nombre d'animaux utilisés en laboratoire.

En ce qui concerne nos recherches, elles consistaient premièrement à identifier un modèle de cancer du sein se comportant, *in vivo*, comme une tumeur avec RE, et deuxièmement, à déterminer les conditions optimales nécessaires à son imagerie par TEP animale. Pour ce faire, nous avons d'abord choisi des lignées de cellules cancéreuses humaines (adénocarcinomes) avec RE : les MCF-7, les T-47D et les MBA-MB-231 (cellules de références). Une fois greffées sur des souris immunodéficientes SCID et NIH-III, nous avons vérifié si elles conservaient leurs RE. Comme nous n'obtenions pas d'expression de RE, ou très peu, nous avons poursuivi les expériences avec des carcinomes mammaires de souris (MC7-L1, MC4-L2 et MC4-L3), greffées sur des souris Balb/c. Nous avons en premier lieu vérifié leur concentration en RE et en deuxième lieu, évalué leur réaction aux traitements de chimiothérapie et d'hormonothérapie. Outre leur concentration en RE, nous avons comparé les taux de croissance, la conservation des RE et la viabilité des tumeurs.

Après étude, nous pouvons conclure que les xénogreffes d'adénocarcinomes croissent beaucoup plus lentement que les carcinomes mammaires de souris et qu'ils perdent leur capacité de fixer le FES, indiquant une perte des RE. Notons que les tumeurs MC4-L3 nécessitant l'insertion d'une capsule progestative pour se développer rapidement et que cette capsule même peut interférer avec les médicaments. Pour ces deux raisons, nous avons décidé d'éliminer les MC4-L3 de nos expériences. Quant aux cellules MC7-L1 et MC4-L2, elles répondent bien à la chimiothérapie et à l'hormonothérapie et permettent d'obtenir d'excellentes images par TEP. Grâce à ces cellules, nous avons démontré qu'il était possible de quantifier leur activité métabolique comme leur concentration en RE *in vivo* par TEP; elles représentent donc de bons modèles pour expérimenter différents médicaments.

Une fois complétée la validation des lignées de cellules, nous avons évalué leur réponse à la thérapie en mesurant leur activité métabolique par captation de FDG à l'aide de l'imagerie TEP. Le calcul de valeurs de captation standardisées (SUV) fiables nécessite la prise en considération de différents paramètres : le poids de l'animal, la taille et le volume partiel de la lésion, la résolution de la caméra, l'acquisition des images TEP, la pharmacocinétique du traceur et la glycémie. Par la suite, lorsqu'il s'agit de sujets animaux, comme dans notre cas, les données SUV doivent être converties en pourcentage de dose injectée par unité de poids (%DI/g).

Comme le taux de captation de FDG dépend principalement de la glycémie, nous avons fait en sorte de l'uniformiser chez toutes les souris utilisées pour les expériences en les faisant jeûner quinze heures avant de prendre les mesures. D'une part, les mesures obtenues nous ont montré que la coprophagie et la présence de tumeurs n'influent pas sur la glycémie, contrairement à la nourriture. D'autre part, nous avons noté une variation non négligeable du taux de glycémie au moment d'obtenir les images. Nous croyons que cela pourrait résulter du stress qu'ont subi les animaux lors de l'injection et de l'anesthésie.

Pour ce qui est des résultats avec la chimiothérapie, nous avons constaté qu'une seule dose de 10 mg/kg de doxorubicine (DOX) est plus efficace que deux doses de 5 mg/kg du même médicament. De plus, 10 mg/kg de DOX sont plus efficaces que 12 mg/kg de méthotrèxate (MTX). Cela a été observé en mesurant uniquement l'activité métabolique des cellules avec la TEP.

I. INTRODUCTION

Au Canada, le cancer du sein occupe la deuxième place parmi les cancers entraînant la mort, après le cancer du poumon. Chez la femme, particulièrement, le cancer du sein se distingue comme étant la maladie la plus répandue au Canada ainsi que dans la majorité des pays industrialisés. En effet, on prévoit que 21 200 nouveaux cas seront diagnostiqués cette année au Canada et que 5300 d'entre eux engendreront la mort. On estime, de surcroît, qu'avec le vieillissement de la population, le cancer du sein touchera de plus en plus de femmes d'ici dix ans. Ainsi, on pense qu'une Canadienne sur neuf en sera atteinte et qu'une sur vingt-sept en mourra (Santé Canada et Société canadienne du cancer, 2004).

Étant donné ces faits, il est impératif de poursuivre les recherches dans la lutte contre le cancer du sein. Aussi, dans ce travail nous verrons, outre les causes, les outils de dépistage de ce cancer et l'efficacité des traitements ayant cours.

1. CANCER DU SEIN

1.1 Origine du cancer du sein

Le cancer du sein est causé par des cellules qui se divisent anormalement. Ces cellules cancéreuses peuvent détruire le tissu mammaire et coloniser d'autres tissus (métastatiques).

Comme le montre la figure 1, le sein est formé de glandes mammaires groupées en lobules, de canaux galactophores et de tissus adipeux. Il existe deux grandes classes d'adénocarcinomes mammaires, les carcinomes lobulaires qui se développent dans les lobules et les carcinomes canaux qui se développent dans les canaux galactophores. Non seulement, les carcinomes canaux représentant le type le plus fréquent du cancer du sein, mais ils peuvent migrer dans d'autres tissus ou organes, causant des métastases.

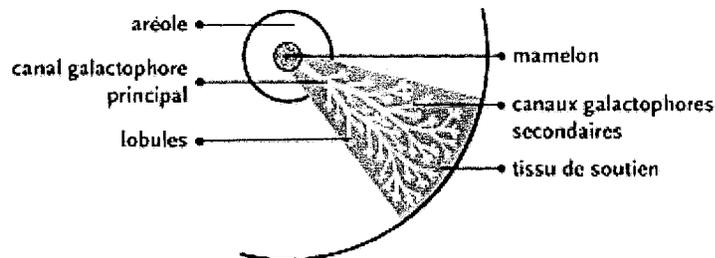


Figure 1 Sein (source : Société canadienne du cancer).

1.2 Facteurs de risque

Plusieurs facteurs de risque pouvant être impliqués dans le cancer du sein ont été suggérés, voici les plus importants :

Facteurs génétiques

De nombreux gènes interviennent dans le développement du cancer du sein. Les BRCA1 et BRCA2 en sont des exemples. Situés respectivement sur les chromosomes 17 et 13, ces gènes sont présents chez environ 1 % des femmes et seraient à l'origine de 3 % à 8 % des cancers du sein (Easton et al., 1993). Par conséquent, si les gènes BRCA1 ou BRCA2 sont détectés chez une patiente, son risque de développer un cancer du sein au cours de sa vie peut passer de 11 % à 50 % - 85 % (Brody et al., 1998). Des tests génétiques servant à prédire la probabilité d'un cancer du sein existent, mais peu de données sont disponibles sur l'efficacité des stratégies de prévention à l'intention des personnes à haut risque. Avant qu'on ne procède systématiquement au dépistage des gènes BRCA1 ou BRCA2, il faudra attendre d'autres études pour confirmer l'utilité de cette approche.

Facteurs géographiques

Certains chercheurs, dont Key (Key et al. 1990), ont réalisé une étude chez des Chinoises âgées entre 35 et 64 ans, vivant en régions rurales, où le taux de cancer du sein est extrêmement faible. Les résultats ont été comparés avec le profil hormonal de femmes britanniques à haut risque. On a trouvé, entre autre, que les Britanniques âgées entre 35 et 44 ans avaient, en moyenne, des concentrations d'œstradiol 36 fois plus élevées que les Chinoises du même groupe d'âge. Une partie de l'explication pourrait résider dans le fait que les Chinoises ovulent moins fréquemment et que leurs corps jaunes se développent moins bien. La diète et la dépense d'énergie pourraient être à l'origine des différences

ovulatoires ou œstrogéniques observées chez les Britanniques et les Chinoises (Bernstein et Ross, 1993).

Facteurs hormonaux

D'après les études, les femmes ayant connu des règles précoces (avant 12 ans) ou une ménopause tardive (après 55 ans) ont un risque beaucoup plus élevé de développer un cancer du sein. Cela découlerait en partie du fait que le début et la fin des règles coïncident avec l'émergence et la disparition de la production d'œstrogènes chez la femme. Ceci pourrait aussi expliquer pourquoi les femmes âgées entre 55 et 69 ans soient plus à risque, en raison de nombreuses années d'exposition aux œstrogènes. Notons que ce facteur constitue le dénominateur commun à la grande majorité des facteurs de risque liés au cancer du sein (Clemons et Goss, 2001).

Autres facteurs

Les autres facteurs comprennent, entre autres, l'absence de grossesse ou une première grossesse après l'âge de 30 ans, l'obésité, la consommation de cigarettes et d'alcool, des pathologies mammaires existantes (e.g. hyperplasie lobulaire ou canalaire) et facteurs environnementaux comme les radiations ionisantes (Anchisi et al., 2001).

1.3 Prévention

La prévention consiste en l'exclusion ou la diminution des facteurs de risques connus. Citons comme exemple l'adoption d'un régime de vie sain : cesser de fumer, réduire la consommation d'alcool, s'adonner à des activités physiques (réduction de 30 % à 40 % des risques) comme la marche rapide et adopter une alimentation faible en gras mais riche en fruits et légumes frais, noix, céréales et produits à base de soya. Il faut aussi songer à diminuer son exposition aux pesticides ou autres produits chimiques et à reconsidérer l'utilisation de la pilule contraceptive (Société canadienne du cancer, 2004).

Par ailleurs, dans certains cas d'antécédents familiaux de cancer, on utilise en traitement préventif le raloxifène et le tamoxifène, malgré que ce dernier entraîne des résultats peu encourageants. De fait, une étude aléatoire américaine menée sur le tamoxifène a démontré une diminution de l'incidence du cancer du sein de 49 % au bout de 5 ans (Chlebowski et al., 1999), mais deux autres études, anglaise et italienne, n'ont indiqué aucun bénéfice (Veronesi et al., 1998). On a même constaté un effet stimulant sur le cancer, qui avait développé une résistance au médicament. Quant au raloxifène, une étude aléatoire visant à déterminer son action préventive sur l'ostéoporose a par ailleurs conclu à une diminution de l'incidence du cancer du sein de 76 % (Levine et al., 2001).

Le cancer du sein étant d'origines multiples, la prévention en est difficile. Il faut donc favoriser le dépistage afin d'abaisser le taux de mortalité.

1.4 Dépistage et diagnostic

Si un cancer du sein est soupçonné, le médecin procédera d'abord à un examen clinique complet afin de détecter la présence de ganglions anormaux aux aisselles et à la base du cou. Par la suite, différents outils serviront à établir un diagnostic. Parmi les plus courants figure la mammographie. De nombreuses études ont prouvé que la mammographie effectuée régulièrement peut réduire d'environ 30 % la mortalité par cancer du sein chez les femmes de 50 à 69 ans (Kerlikoske et al., 1995). Notons qu'en deçà de 40 ans, le dépistage est plus difficile car le tissu mammaire est plus dense chez la jeune femme que chez la femme plus âgée. Ajoutons qu'avec cette technique, jusqu'à 10 % des cancers ne sont pas dépistés et de nombreux faux positifs sont obtenus. Un examen scintigraphique au ^{99m}Tc -mibi est souvent réalisé pour confirmer si une lésion suspecte à la mammographie est maligne.

Comme autre outil, il existe l'échographie qui est souvent plus performante chez les femmes jeunes qui ont des seins très denses. Le diagnostic final doit être confirmé à l'aide d'une biopsie. Cette technique consiste à prélever une partie d'une zone suspecte pour procéder à un examen anatomopathologique au microscope. Si un cancer du sein est décelé, l'anatomopathologie peut en préciser

le type. Si la biopsie révèle la présence d'un cancer, il convient de procéder à des examens plus poussés sur la tumeur comme le dosage des récepteurs des œstrogènes et de la progestérone. Ces examens ont pour but de déterminer si ce cancer est susceptible de répondre à une hormonothérapie.

Dans le cas d'une confirmation, il incombe de savoir si la maladie s'est étendue à d'autres parties de l'organisme. Il faut alors avoir recours à des tests supplémentaires comme une imagerie pan corporelle par rayons X, des scintigraphies ou une tomographie d'émission par positrons (TEP).

Après évaluation de la tumeur, vérification de l'existence ou non d'un envahissement ganglionnaire et de la présence de métastases, le médecin peut déterminer le stade de la maladie, puis décider d'un protocole de traitement avec sa patiente.

2. ŒSTROGÈNES ET CANCER DU SEIN

2.1 Rôle des œstrogènes

Les œstrogènes font partie de la famille des hormones stéroïdiennes. Réparties en trois groupes, l'œstradiol, l'œstrone et l'œstriol, ils participent à la régulation de nombreuses fonctions. Ainsi, à la puberté, les œstrogènes provoquent l'amincissement de la peau, le dépôt du tissu adipeux aux hanches et

aux seins, la modification des cordes vocales et l'arrêt de la croissance des os longs. Ils contrôlent en plus le développement et le maintien des organes sexuels ainsi que le maintien du cycle menstruel et de la grossesse. Au cours des menstruations, les concentrations plasmatiques d'œstradiol, faibles au début de la phase folliculaire, approximativement 100 pg/mL, grimpent jusqu'à 700 pg/mL, au moment du pic pré-ovulatoire. Après la ménopause, les concentrations chutent et deviennent comparables à celles de l'homme (de 5 à 20 pg/mL) (Greenspan et al. 1994).

Les autres rôles des œstrogènes comprennent la régularisation du cholestérol dans le foie. Cela prévient la formation de caillots et empêche la formation de plaques athérosclérotiques dans les artères coronariennes, et par conséquent des infarctus du myocarde, des coronaropathies et des accidents cardiovasculaires (Mora et al., 2001). De plus, ils régularisent la température du corps, le processus de cicatrisation, le maintien des fonctions cognitives (diminuent les risques de l'Alzheimer) et l'équilibre entre la formation et la dégradation du tissu osseux (ostéoporose) (Turner et al., 1994).

Malgré ces bons côtés, les « anges de vie » peuvent devenir des « anges de mort », comme le dit si bien Ercole Cavaliere (Lee, 2001). Tout d'abord, nous savons que les œstrogènes jouent un rôle important dans la croissance cellulaire. En se liant à des récepteurs d'œstrogènes, ils modifient la croissance cellulaire. Les complexes hormone-récepteur se lient à l'ADN et activent des gènes qui

commandent la division cellulaire. Il arrive qu'une accélération de la vitesse de réplication de l'ADN se produise, accroissant les risques d'une expansion clonale de cellules prénéoplasiques et d'une mutation carcinogène, potentiellement irréparable. Voilà pourquoi on croit qu'une exposition prolongée aux œstrogènes favorise l'apparition du cancer du sein (Cavalieri et Rogan, 2002).

2.2 Biosynthèse et métabolisme des œstrogènes

Les œstrogènes, comme tous les stéroïdes, dérivent d'abord de la transformation du cholestérol en prégnénolone. Le prégnénolone produit ensuite de l'androsténédione et de la testostérone. La principale réaction enzymatique constitue la transformation de la testostérone et de l'androsténédione en œstrogènes : l'œstradiol (17 β -estradiol, E₂) et l'œstrone (E₁). La réaction se produit sous l'influence d'une enzyme, l'aromatase, constituée d'un cytochrome P-450 et d'un cytochrome réductase, utilisant le nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADPH) comme réducteur. L'aromatase est présente dans l'ovaire, mais aussi dans le foie, les muscles, les follicules adipeux et certains tissus tumoraux comme les carcinomes mammaires (Figure 2).

organes cibles tels l'hypothalamus, l'hypophyse, le sein, l'appareil génital, l'utérus et les ovaires.

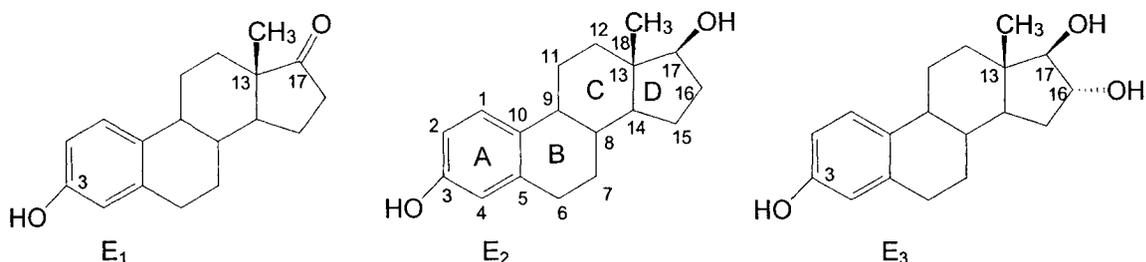


Figure 3 Famille des œstrogènes : œstrone (E₁), 17β-œstradiol (E₂), œstriol (E₃).

Des enzymes comme les cytochromes P-450 (CYP1A1 et CYP1B1) dégradent les œstrogènes en six métabolites (figure 2) : le 2-hydroxyestrone (2-OH-E₁), le 2-hydroxyestradiol (2-OH-E₂), le 4-hydroxyestrone 4-(OH-E₁), le 4-hydroxyestradiol (4-OH-E₂), le 16 α -hydroxyestrone (16 α -OH-E₁) et le 16 α -hydroxyestradiol (16 α -OH-E₂). Ces métabolites sont ensuite transformés en catécholestrogènes, qui sous l'action d'autres CYP ou de peroxydases, peuvent former des semi-quinones et des quinones. Ce sont en fait ces derniers qui sont soupçonnés d'être les véritables responsables du cancer du sein.

2.3 Récepteurs d'œstrogènes

Les récepteurs d'œstrogènes (RE), des protéines intracellulaires, font partie de la grande famille des récepteurs nucléaires hormonaux, soit les récepteurs de l'hormones thyroïdiennes, de l'acide rétinoïque et de la vitamine D. Leur rôle est de régulariser la transcription génique : au début, les œstrogènes pénètrent passivement la membrane cellulaire puis se lient aux récepteurs, dont la configuration subit une modification. Le complexe actif œstrogène-récepteur va

ensuite se fixer sur une séquence consensus de l'acide désoxyribonucléique (ADN) appelé élément de réponse œstrogénique ou *Estrogen Response Element* (ERE). Il en résulte la formation de l'acide ribonucléique messager (ARNm) et la synthèse d'une protéine spécifique.

Il existe deux types de RE, le récepteur d'œstrogène alpha (RE-alpha) et le récepteur d'œstrogène bêta (RE-bêta) (Mosselman et al., 1996; Kuiper et al., 1996). Tandis que RE-alpha se retrouve dans presque tous les tissus de l'organisme, le RE-bêta n'a été identifié que dans certains tissus tels le sein, la prostate, l'utérus, les ovaires, les testicules, la vessie, les poumons, l'endothélium vasculaire, le myocarde et le cerveau. Pour ce qui est des tumeurs mammaires, on y retrouve les deux types de RE. Le RE-alpha, découvert en 1986 (Green et al., 1986a), a largement été étudié. Il sert d'ailleurs de marqueur de prédiction en clinique et de cible pour un traitement. Il en va différemment pour le RE-bêta, découvert seulement en 1996 (Mosselman et al., 1996), qui n'a pas encore livré tous ses secrets sur son rôle potentiel dans la progression du cancer du sein (Roger et al., 2001).

Le RE alpha est formé de 595 acides aminés, contre 530 pour le RE bêta. Ces deux isoformes présentent une grande similitude et sont constitués de plusieurs domaines fonctionnels spécifiques et nécessaires à leurs activités. Ces différents domaines sont contrôlés par deux fonctions d'activation de la transcription (*Transcription Activation Function* : TAF) la TAF-1 et la TAF-2. Sur la

figure 4, on note, à l'extrémité gauche, le domaine N-terminal, formé de deux domaines (A/B) de longueur variable comportant la TAF-1. Vient ensuite le domaine C, contenant le domaine ADN (DBD: *DNA Binding Domain*), dont la liaison est assurée par le site de dimérisation qu'il contient. Le domaine D (Ch) quant à lui représente la région charnière du récepteur. Finalement, à l'extrémité droite, se trouve le domaine C-terminal, formé des domaines F et E (LBD : *Ligand Binding Domain*) où interagit la TAF-2. Habituellement, les régions TAF-1 et TAF-2 agissent de façon synergique, bien qu'elles puissent fonctionner de manière tout à fait indépendante. L'activité des TAF-1 et TAF-2 varie selon le promoteur et le type cellulaire, ce qui peut partiellement expliquer la sélectivité tissulaire de quelques ligands des RE. En effet, le domaine de liaison de l'ADN (DBD) présente une homologie de 96 %, contre 53 % pour le domaine de liaison de l'œstrogène (LBD). Malgré leur similitude, les RE-alpha et RE-bêta sont distincts sur les plans structurels et fonctionnels (McDonnell, 1995; McDonnell et al., 1997).

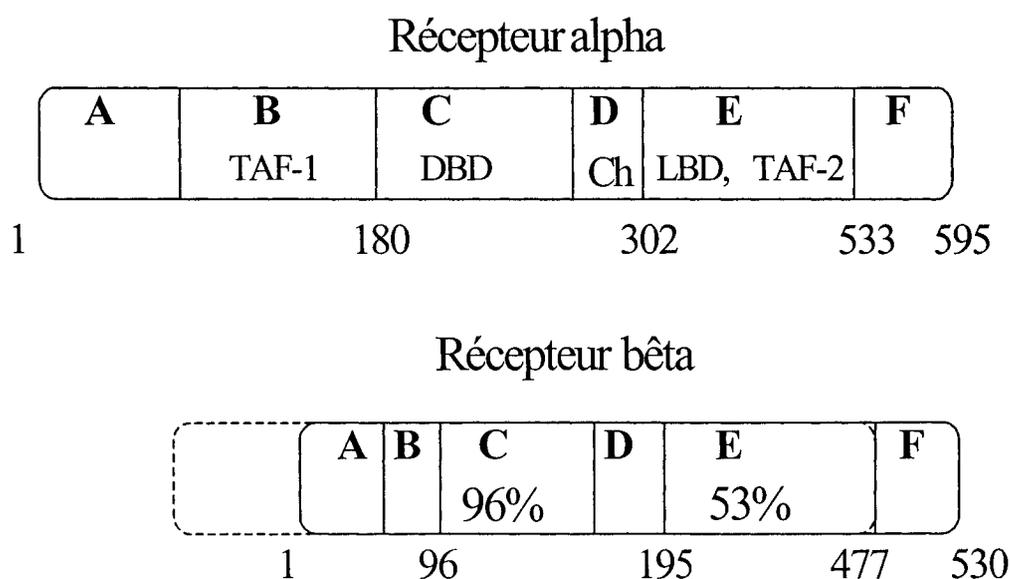


Figure 4 Structures des récepteurs d'œstrogène alpha et bêta chez l'humain.

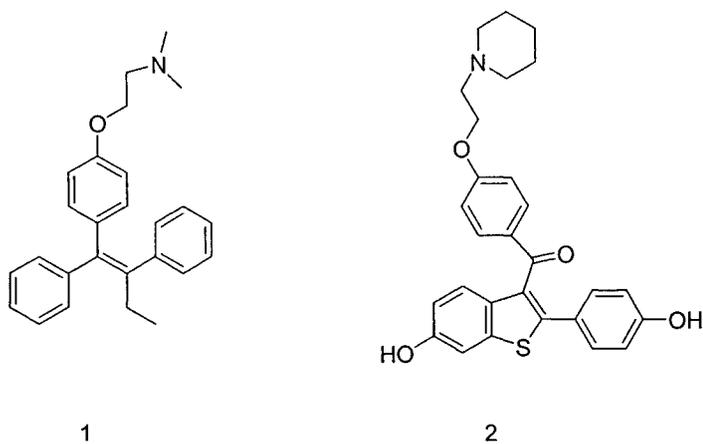
Les RE-alpha et RE-bêta peuvent former des hétérodimères (dimères formés d'un RE-alpha et d'un RE-bêta), mais aussi des homodimères (dimères formés de deux RE-alpha ou de deux RE-bêta). Par conséquent, la régulation œstrogénique de l'expression génique est plus complexe et la compréhension des mécanismes d'action des œstrogènes, plus difficile, surtout quand il est question de tissus exprimant les deux isoformes (Pettersson et Gustafsson, 2001).

2.4 Modulateurs sélectifs des récepteurs d'œstrogènes (MSRE)

Les modulateurs sélectifs des récepteurs d'œstrogènes forment une famille de ligands. Ils modifient la configuration des RE lorsqu'ils s'y lient et démontrent une action antagoniste ou agoniste partielle selon les tissus. Plusieurs facteurs sont en jeu : l'élément de réponse prépondérante (ERE par rapport au AP-1), la présence et la concentration de co-activateurs et de co-répresseurs de transcription dans le tissu, l'affinité relative du MSRE avec les deux types de RE, ainsi que la présence simultanée et les proportions de ces derniers dans le tissu (Paech et al., 1997). Selon la voie classique incluant le ERE, seuls les MSRE agonistes purs peuvent activer le RE-bêta, alors qu'il peut s'agir d'agonistes purs ou partiels lorsqu'il est question de RE-alpha.

La liste des MSRE est de plus en plus longue, on y retrouve les triphényléthylènes, analogues du tamoxifène (TAX), les benzothiophènes, analogues du raloxifène (RAL), les benzopyrans, les dihydronaphthylènes et les tétrahydronaphthylènes (figure 5). Seuls le TAX et le RAL ont été profondément

étudiés relativement à leurs effets sur le sein, l'os, le système cardiovasculaire, le métabolisme des lipides et l'endomètre. Ils ont un effet antagoniste ou agoniste partiel selon le contexte tissulaire (Buzdar, 2001).



(1) Tamoxifène, (2) Raloxifène

Figure 5 Structures chimiques du tamoxifène et du raloxifène.

Vu les effets variés du TAX et du RAL, que nous verrons à la section portant sur l'hormonothérapie, on a développé les antagonistes purs ICI182,780 et ICI164,384 (Figure 6). Ceux-ci peuvent entraver la dimérisation du récepteur, empêcher la liaison du complexe RE-ligand à l'ADN, inhiber les TAFs et, dans certains cas, augmenter le catabolisme du RE en transportant le complexe RE-ligand dans les lysosomes.

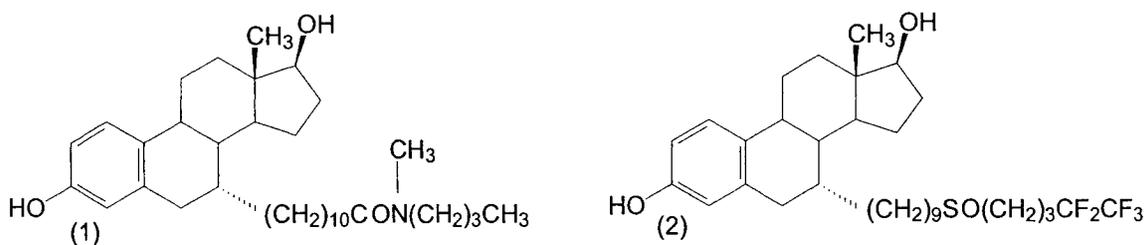


Figure 6 Structure des ICI 164,384 et ICI 182,780.

2.5 Œstrogènes et cancer du sein

L'exposition prolongée aux œstrogènes favorise le développement de certains cancers, particulièrement celui du sein. De fait, les études chez des animaux ont à plusieurs reprises démontré que les œstrogènes peuvent induire et favoriser la stimulation de la croissance des tumeurs mammaires *in vivo* (Lupulescu, 1995; Bradlow et al., 1985). Une des causes souvent invoquées est que les œstrogènes stimulent la prolifération des cellules épithéliales du tissu mammaire en activant les RE, ce qui déclenche une cascade de réactions se terminant par une mitose (Martin et al., 1990). Pour des raisons encore inconnues, une ou plusieurs réactions peuvent subir des modifications ayant pour effet une dérégulation dans la prolifération cellulaire (MCKenzie et Sukumar, 1996; Herderson, 2000).

Par ailleurs, on a identifié des interactions protéine-protéine plus ou moins directes entre le RE et d'autres familles de facteurs transcriptionnels (p. ex., les protéines fos et jun) qui régulent l'expression des gènes nécessaires au phénotypes invasifs et métastatiques (Philips et al., 1993). De plus, des données récentes ont révélé que chez l'humain, le coactivateur AIB1 (Amplified in Breast Cancer 1) est surexprimé dans les tumeurs du sein, mais pas dans le tissu normal avoisinant, suggérant que la surexpression de ce coactivateur peut contribuer à modifier l'action de l'œstrogène durant la carcinogenèse du sein (Anzick et al., 1997; Murphy et al., 2000).

Enfin, depuis quelques années, certains cathécholestrogènes sont souvent pointés comme étant responsables de la tumorigénèse mammaire (Liehr et al.,1987; Coumoul et Barrouki, 2002). En voici des exemples : le 16 α -hydroxyestrone, lié de façon covalente aux RE, favorise une expression prolongée des gènes. Une hyperprolifération cellulaire s'en suit, endommageant l'ADN (Swanek et al.,1988; Bradlow et al.,1986); le E₂3,4-quinones, le plus néfaste, réagit avec l'ADN pour former des dérivés de l'oxygène très toxiques, les N-7 de guanine et N-3 d'adénine, qui susciteront des mutations oncogéniques conduisant à l'apparition du cancer (Cavalieri et al., 2000; Cavalieri et Rogan 2002).

2.6 Xénoœstrogènes

Nous avons vu que les métabolites de l'œstradiol sont les véritables initiateurs du cancer. Mais il existe des xénoœstrogènes, c'est-à-dire des substances chimiques non fabriquées par l'organisme, possédant une activité œstrogénique.

Les xénoœstrogènes issus de l'environnement reproduisent l'action des hormones endogènes ou en modifient l'activité. Certains, diminuant les effets des œstrogènes, proviennent souvent des produits alimentaires d'origine végétale (p. ex., aliments à base de soya, choux-fleurs, brocolis) et sont rapidement dégradés dans l'organisme. D'autres, souvent synthétiques, imitent ou

potentialisent les effets des œstrogènes endogènes. Ces variétés amplificatrices, présentes dans certains pesticides (méthoxychlore), ingrédients du plastique (bisphénol A), carburants ou médicaments, sont de plus en plus abondantes et des preuves supportent leurs rôles dans l'étiologie du cancer du sein (Bradlow et al., 1995).

Certains xœstrogènes favoriseraient le cancer en augmentant la production des mauvais métabolites; d'autres se lieraient directement aux récepteurs des œstrogènes, déclenchant la production de signaux de prolifération inappropriés. D'autres composés, enfin, causeraient des dommages directs à l'ADN et favoriseraient la néo-angiogénèse tumorale.

3. CHIMIOTHÉRAPIE ET HORMONOTHÉRAPIE DU CANCER DU SEIN

La façon de traiter le cancer du sein dépend de la nature, de la localisation de la tumeur et du stade de développement de la maladie. Il existe aujourd'hui cinq grandes approches thérapeutiques : la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie et les thérapies ciblées (anticorps monoclonaux, antityrosine-kinase, etc.). Notre recherche axée sur la chimiothérapie et l'hormonothérapie, a porté sur la validation de la réponse de lignées de cellules choisies à certains médicaments actuellement sur le marché.

3.1 Agents cytotoxiques

Le traitement par agents cytotoxiques est systémique, c'est-à-dire qu'il porte sur l'ensemble du corps. S'il y a présence de cancer dans les ganglions lymphatiques, les agents cytotoxiques ou antinéoplasiques seront probablement utilisés. La chimiothérapie aide à éviter la récurrence de la maladie en détruisant toutes les cellules cancéreuses qui se sont propagées à partir du sein ou de l'aisselle. Elle est généralement proposée après la chirurgie, pendant une période de quatre à six mois, mais peut également être utilisée avant l'intervention, pour réduire la taille d'une tumeur. Les médicaments peuvent être administrés par voie orale ou par injection intraveineuse. Puisque ces médicaments affectent également les cellules saines, les patientes peuvent présenter des effets secondaires tels que fatigue, diminution de la résistance aux infections, perte d'appétit, nausées ou vomissements, stomatites et chute des cheveux. La chimiothérapie peut aussi perturber le cycle menstruel et même provoquer une aménorrhée (absence de règles); certaines molécules peuvent en outre entraîner une stérilité, le plus souvent provisoire. Dans le cadre de notre recherche, nous avons utilisé le méthotrèxate et le doxorubicine (figure 7).

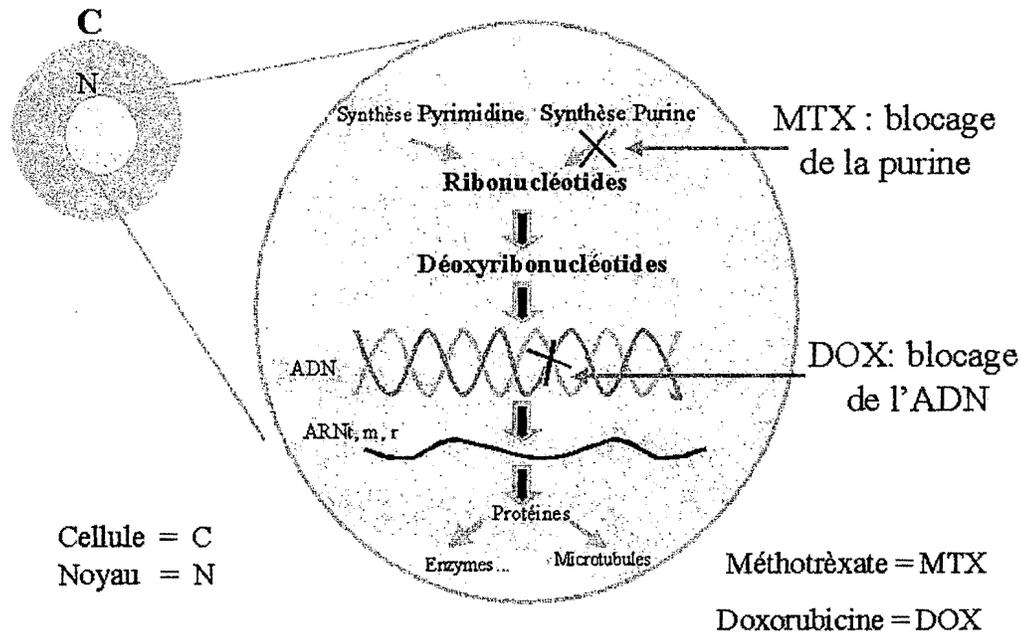


Figure 7 Mécanisme d'action du MTX et de la DOX (modifié à partir de : Goodman and Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics 10^{ème} édition p1382 (2002)).

3.1.1 Mécanisme d'action du méthotrexate

Le méthotrexate (MTX) est un agent chimiothérapeutique qui a été découvert en 1940 dans le début du traitement de la leucémie (Farber et al., 1948). Le MTX est un antagoniste de l'acide folique et est utilisé dans différents traitements standards pour plusieurs néoplasies, comme le carcinome du chorion, la leucémie lymphoblastique aigüe, les lymphomes, les ostéosarcomes, le cancer de la tête et du cou, ainsi que le cancer du sein (Fleming et Schilsky, 1992).

Le MTX est un inhibiteur compétitif de l'acide folique au niveau de l'enzyme dihydrofolate réductase (DHFR), l'enzyme responsable de la réduction du 7,8-dihydrofolate (FH₂) en 5,6,7,8-tétrahydrofolate (FH₄). La réduction de l'acide folique

est indispensable pour qu'il soit biologiquement actif et qu'il puisse participer au transport des groupes monocarbonés nécessaire à la biosynthèse des bases purines, de deoxythymidylate et certains acides aminés.

Il existe plusieurs mécanismes de résistance au MTX *in vitro* : 1) une concentration cellulaire diminuée du MTX à cause d'une réduction du transport transmembranaire; 2) un DHFR altéré (ou muté) qui lierait le MTX moins avidement que l'enzyme normale, 3) une augmentation des niveaux de DHFR, par amplification génique, 4) une rétention diminuée du MTX en conséquence d'un manque de polyglutamation, 5) une augmentation des concentrations extracellulaires d'adénosine consécutive à l'activation d'ecto-5'-nucléotidase contribuant à l'activité anti-inflammatoire. (Bertino et al., 1996; Jansen et al., 1998).

Suite à son administration intraveineuse, le MTX se concentre dans les reins, la vésicule biliaire et la rate. La concentration plasmatique devient maximale de 1 à 4 heures après l'administration. Le MTX est majoritairement éliminé dans l'urine sous forme inchangée, le reste est éliminé par la bile et les fèces.

3.1.2 Mécanisme d'action de la doxorubicine

La doxorubicine (DOX) est une anthracycline antibiotique isolée par fermentation aérobie du *Streptomyces peuceus caesius* (DiPiro et al., 1999). On l'utilise pour traiter différentes leucémies et les tumeurs solides dans le cas de

cancers comme ceux des ovaires, des testicules, de la prostate, de la vessie et des poumons. La DOX est particulièrement efficace en ce qui concerne le cancer du sein lorsque associée à d'autres médicaments comme le cyclophosphamide, le méthotrèxate et la fluorouracil. La DOX agit en s'intercalant entre les bases d'ADN, inhibant ainsi la réplication et la transcription des cellules. Elle inhibe également la topoisomérase II, une enzyme chargée de dérouler l'ADN. On croit aussi que la DOX inhibe la synthèse des phospholipides membranaires et la formation de radicaux libres, impliqués dans la toxicité. Par ailleurs, les mécanismes de résistance de la DOX ne sont pas bien connus, ce qui pose un grave problème en oncologie.

En ce qui a trait aux effets néfastes de la DOX, la cardiotoxicité est l'effet le plus important. Cette cardiotoxicité est causée par l'inhibition de l'expression des gènes du myocarde, une surabondance de calcium et des radicaux libres. Bien que la plupart des tissus comportent des mécanismes de défense contre les radicaux libres, le cœur en renferme très peu (DiPiro et al., 1999).

Le risque de cardiotoxicité est proportionnel à une dose cumulative de DOX. À titre d'exemple, l'administration d'une dose de 60 mg/m² à 75 mg/m² toutes les trois semaines conduira à un risque relatif :

$$<400 \text{ mg/m}^2 = 0.14 \%$$

$$550 \text{ mg/m}^2 = 9 \%$$

$$700 \text{ mg/m}^2 = 25 \%$$

Une dose cumulative de 550 mg/m² est considérée maximale en raison du risque élevé de cardiotoxicité si on dépasse cette valeur.

L'administration de la DOX se fait par voie intraveineuse et son élimination, surtout par la bile, les fèces et faiblement par l'urine.

3.2 Hormonothérapie

L'hormonothérapie prévoit une approche différente de celle de la chimiothérapie. Elle vise à réduire l'action de l'œstrogène sur les cellules cancéreuses afin d'empêcher leur croissance. Cet empêchement peut se faire de deux façons, soit par blocage des RE, soit par inhibition de la biosynthèse de l'œstradiol. Les médicaments utilisés en hormonothérapie sont le tamoxifène, le raloxifène et des inhibiteurs d'aromatase (létrozole et exémestane) (Figure 8).

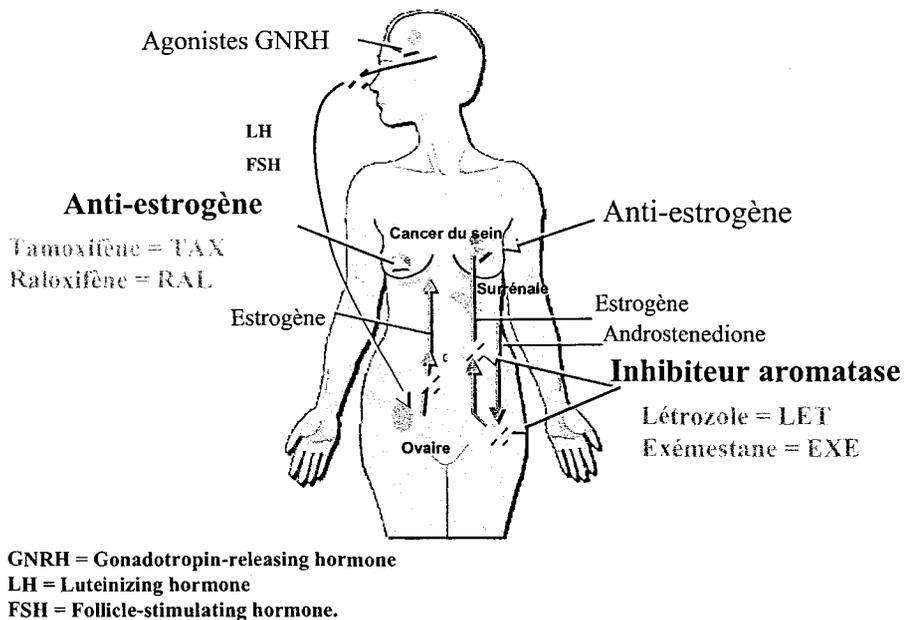


Figure 8 Traitements hormonaux divers du cancer du sein (modifié à partir de : Tellez C. et al. dans *Oncol Clin North Am.* 4 :751-777 (1995)).

3.2.1 Mécanisme d'action du tamoxifène

Synthétisé pour la première fois en 1966, le tamoxifène (TAX) est non-stéroïdien et appartient au MSRE. Il ralentit ou stoppe la croissance des cellules cancéreuses en bloquant leurs RE. Le TAX est bien absorbé par le tractus gastro intestinal, fortement métabolisé par le foie et éliminé via la bile et les fèces.

Le TAX est habituellement pris quotidiennement pendant cinq ans. Ce médicament est utilisé comme thérapie chez les patientes atteintes d'un cancer du sein avec récepteurs d'œstrogènes positif (RE+) et peut protéger les femmes présentant un risque élevé de développer un cancer du sein. Il a aussi été

démontré que le TAX réduit les probabilités de récurrence du cancer du sein de 40 % à 50 % (Vogel, 2001). Cependant, il augmente légèrement le risque de développer un cancer de l'endomètre, de former des thrombus (Dutertre et al., 2000), de provoquer une recrudescence tumorale et souvent, d'induire une résistance de la tumeur au médicament (Buzdar, 2001).

Les mécanismes responsables du développement de la résistance des cellules cancéreuses au TAX sont mal connus. Une hypothèse, quoique contestée, met en cause une faible expression des récepteurs œstrogéniques (Clarke et al., 2001). Par ailleurs, la plupart des tumeurs peuvent présenter d'autres mécanismes de résistance moins bien définis et découlant de multiples facteurs dont un changement dans les systèmes immunitaire et endocrinologique. Les tumeurs pourraient aussi subir des changements, tels une diminution du ratio des RE $\alpha:\beta$ et une modification de la fonction complexe de transcription effectuée par les RE (Clarke et al., 2001). Par contre, de nombreuses études indiquent que le TAX stimule les cellules tumorales plutôt que de les inhiber (Schiff et al., 2003 ; Osborne, 1993). En somme, l'utilisation du TAX devrait être évitée ou arrêtée dès qu'une résistance apparaît pour éviter une stimulation de la croissance tumorale.

3.2.2 Mécanisme d'action du raloxifène

Le raloxifène (RAL) est un modulateur sélectif de l'activation des récepteurs d'œstrogènes (MSRE). Sa liaison aux RE produit des effets variables selon les

tissus : il agit d'une part comme agoniste sur les os et le métabolisme des lipides, et d'autre part, comme antagoniste sur l'endomètre et les seins.

Les premiers essais cliniques sur le RAL ont porté sur le traitement du cancer du sein métastatique. Toutefois, pratiquement toutes les données cliniques sur ce composé proviennent d'études sur la prévention et le traitement de l'ostéoporose. Ces études, menées auprès de femmes postménopausées (âge moyen : 66 ans et demi), visaient à évaluer, au bout de 40 mois, les effets du RAL sur les fractures vertébrales et la densité minérale osseuse, ainsi que sur le risque de développer un cancer du sein et de l'endomètre. On a observé une diminution de 76% du risque de développer un cancer du sein (Cummings et al., 1999; Ettinger et al., 1999). Les conclusions d'une autre étude portant sur 48 mois, mentionnent une diminution de 72 % du risque de cancer du sein. De plus, le risque de cancer et d'hyperplasie de l'utérus n'avait pas augmenté et aucune différence n'avait été observée dans la fréquence des saignements vaginaux et de la douleur mammaire après administration de RAL. (Cauley et al., 2001).

Les effets secondaires du RAL incluent l'apparition de symptômes vasomoteurs et un risque de thromboembolie veineuse comparable à celle observée à la suite de l'oestrogénothérapie. Il n'existe par ailleurs aucune donnée prouvant une réduction quelconque des maladies cardiovasculaires attribuables au RAL.

Lorsque administré par voie orale, le RAL est rapidement absorbé par le tractus gastro-intestinal, métabolisé par le foie et éliminé principalement par la bile et les fèces.

3.2.3 Mécanisme d'action du létrozole

Chez la femme ménopausée, la synthèse des œstrogènes s'effectue essentiellement grâce à l'aromatase qui transforme les androgènes surrenaliens, principalement l'androstènedione et la testostérone, en E₁ et E₂. Il est possible d'empêcher la biosynthèse des œstrogènes, tant dans les tissus périphériques que dans le tissu cancéreux par une inhibition spécifique de l'aromatase. Le létrozole (LET) est un inhibiteur non-stéroïdien de l'aromatase qui se lie de façon réversible à cet enzyme. Cette liaison entre l'aromatase et le LET est hautement spécifique, amenant ainsi une diminution de la biosynthèse des œstrogènes dans tous les tissus. Le LET exerce son effet antinéoplasique en privant les cellules cancéreuses mammaires hormonodépendantes de l'un de leurs stimulus de croissance. Il est à noter que la supériorité des inhibiteurs de l'aromatase sur le TAX a récemment été prouvée (Baum et al., 2002).

En effet, un essai clinique à grande échelle de phase III, mené à double insu, avec répartition aléatoire et bien contrôlée, a été réalisé auprès de patientes ménopausées atteintes d'un cancer du sein localement avancé ou métastatique. Après répartition aléatoire, les patientes ont reçu 2,5 mg/jour de LET ou 20 mg/jour

de TAX. Avec récurrence et l'apparition de nouveaux cancers aux métastases comme principaux paramètres d'évaluation de l'essai, on a constaté une meilleure réponse au LET qu'au TAX chez les participantes (Goss et al., 2003).

Le LET administré oralement est absorbé rapidement et complètement par le tube digestif. Sa biodisponibilité absolue est de 99,9 % et sa liaison aux protéines plasmatiques, essentiellement à l'albumine, de 60 %. La concentration du LET dans les érythrocytes représente 80 % de la concentration plasmatique libre . Cela a été vérifié suite à l'administration de 2,5 mg/jour de LET marqué au ¹⁴C. Environ 82 % de la radioactivité plasmatique correspond au médicament inchangé. L'exposition systémique aux métabolites est donc faible. Le LET est principalement éliminé grâce aux isoenzymes 3A4 du cytochrome P-450, qui le transforment en métabolites de carbinol inactif.

3.2.4 Mécanisme d'action de l'exémestane

L'exémestane (EXE) est lui aussi un inhibiteur stéroïdien de l'aromatase qui contrairement au LET, se lie de façon irréversible à cet enzyme. Il fait partie de la deuxième génération des inactivateurs irréversibles stéroïdiens de l'aromatase. Il se distingue des non-stéroïdiens par sa structure chimique qui ressemble à celle de l'androstènedione et par son mécanisme d'action propre, soit l'inactivation irréversible de l'aromatase. Tout comme les inhibiteurs de l'aromatase non-stéroïdiens de troisième génération, l'exémestane est très sélectif et n'agit pas sur

le cortisol, l'hormone folliculostimulante, l'hormone lutéinisante et l'aldostérone (Santen et al., 1999; Scott et al, 1999).

La pharmacocinétique de l'EXE présente une rapide absorption après son administration orale. Sa biodisponibilité est de 42% et l'EXE se lie à 90% aux protéines plasmatiques (albumine, glycoprotéine). La concentration plasmatique maximale est atteinte dans les deux heures suivant son administration. Cet agent est métabolisé par le cytochrome P-450 3A4 et par des aldocétoréductases. Les métabolites produits sont inactifs ou exercent une très faible action sur l'aromatase par rapport à la substance mère (Clemett et Lamb, 2000).

L'EXE est éliminé par les urines et par les fèces en proportions à peu près égales. Moins de 1 % de l'EXE se retrouve sous forme inchangée dans l'urine. Sa demi-vie d'élimination est de 27 heures.

4. MÉTHODES D'IMAGERIE UTILISÉES POUR LE DIAGNOSTIC DU CANCER DU SEIN

Il existe plusieurs méthodes d'imagerie pour détecter la présence du cancer du sein. Nous allons ici nous limiter aux trois plus importantes, soit la mammographie, la scintigraphie et la tomographie d'émission par positrons.

4.1 Mammographie

La mammographie est actuellement la seule méthode disponible pour dépister le cancer du sein à grande échelle. Cette technique permet généralement de détecter facilement un carcinome dans un sein grasseux, mais non fibreux et dense. Outre cet inconvénient, on rapporte un taux de faux négatif de l'ordre de 25 % à 30 % de même qu'une spécificité et une valeur prédictive positive basses (10 % à 30 %) dans le cas de cancers non palpables. En effet, cette technique ne peut pas distinguer formellement les lésions bénignes des malignes (Khalkhali et Vargas, 2001). Dans le but d'améliorer la spécificité, la médecine nucléaire offre des tests avec différents radiotraceurs (Gopalan et al., 2002)

4.2 Scintigraphie

La scintigraphie, tout comme la tomographie d'émission par positrons dont nous discuterons dans la prochaine section, permet de visualiser les processus physiologiques, contrairement à la mammographie, à la tomodensitométrie ("CT" pour "Computed Tomography") ou à l'imagerie par résonance magnétique (IRM), qui sont des modalités d'imagerie surtout anatomiques.

L'appareil de scintigraphie est composé de caméras utilisant un système de collimation ainsi que des cristaux à scintillation sensibles aux rayons gamma d'une énergie allant de 100 à 300 keV, typique des radiotraceurs utilisés en médecine

nucléaire conventionnelle. L'image obtenue est planaire (2D) et illustre la biodistribution du traceur. Il est aussi possible d'obtenir des images tridimensionnelles en faisant tourner la tête des caméras autour du sujet, il s'agit alors de la tomographie d'émission monophotonique (TEM ou "SPECT : Single Photon Emission Computed Tomography").

Parmi les radiotraceurs utilisés pour la détection de tumeurs mammaires, on trouve les suivants :

Anticorps monoclonaux. Utilisés en radioimmunosciintigraphie, ils sont liés à un radionucléide émetteur de rayons gamma. Plusieurs combinaisons d'anticorps monoclonaux et de radionucléides, tels que le ^{131}I , le ^{111}In et le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ont été étudiées (Goldenberg et Nabi, 1999). Cependant, il est actuellement difficile de recommander l'un de ces anticorps, car les résultats sont en général décevants, dû au faible gradient de captation entre les tumeurs et le tissu non ciblé. L'efficacité de la radioimmunosciintigraphie dépend de l'affinité des anticorps monoclonaux avec certains antigènes à la surface de la tumeur (de nombreux antigènes ont été découverts dans le cancer du sein). Les anticorps vont donc se fixer à certains antigènes comme l'antigène carcino-embryogénique (CEA), la mucine épithéliale polymorphique (MUC1), la glycoprotéine antigénique tumorale 72 (TAG-72) et le récepteur transmembranaire de facteur de croissance (HER-2/nue ou c-erbB2).

Méthylène diphosphonate marqué au technétium-99m (^{99m}Tc -MDP). Dans le cas des tumeurs supérieures à 1,5 cm, cet agent de scintigraphie osseuse démontre une sensibilité environnant les 71 % et une spécificité de 62%. Si la tumeur mesure moins de 1 cm, la sensibilité et la spécificité sont très faibles (nombreux faux positifs). Notons que le ^{99m}Tc -MDP permet aussi de détecter les métastases osseuses (Piccolo et al., 1995; Arslan et al., 2000).

Thallium-201 (^{201}Tl). Transporté par la pompe à sodium et à potassium ($\text{Na}+\text{K}+\text{ATPase}$), cet agent a été considéré comme un traceur de choix pour l'étude de la perfusion myocardique. Au cours des dernières années, son potentiel oncotropique a été exploité *in vitro* et *in vivo* pour différents types de cancer, en particulier celui du sein. Des études cliniques ont été effectuées afin de déterminer l'efficacité du ^{201}Tl dans le diagnostic du cancer du sein et de ses métastases (Cimitan et al., 1995). La faible efficacité observée découle de la faible énergie du gamma émis par le radionucléide (70-80 keV). En outre, on note une bonne spécificité mais une sensibilité très faible.

Méthoxisobutyisonitrile (MIBI) marqué au technétium-99m (^{99m}Tc -Sestamibi). Le MIBI a été utilisé en imagerie des tumeurs pour la première fois en 1987 (Muller et al., 1987). Le mécanisme de captation par la cellule tumorale, encore à l'étude, dépendrait de la lipophilicité et de la charge que présente le MIBI. S'il est chargé positivement, sa diffusion passive dans la cellule lui permettrait une association avec la mitochondrie, chargée négativement. La captation ainsi créée

est corrélée par le flot sanguin, le haut niveau de mitochondrie et la viabilité cellulaire.

Le ^{99m}Tc sestamibi servant surtout dans le cas de tumeurs mammaires palpables, il démontre une sensibilité atteignant les 90 % et une spécificité de 85 % (Taillefer, 1999). La scintimammographie au MIBI est indiquée dans des situations cliniques précises et comme méthode d'examen complémentaire à la mammographie standard. Elle contribue à l'amélioration de la spécificité et à la distinction de nombreuses biopsies blanches.

4.3 Tomographie d'émission par positrons (TEP)

Le principe de la TEP repose sur la désintégration d'un proton en neutron avec l'émission d'un positron (β^+) et d'un neutrino (ν). Après un parcours de quelques millimètres dans les tissus, durant lequel il perd son énergie cinétique, le positron s'annihile avec un électron (β^-) du milieu environnant. Cette annihilation produit deux photons de 511 keV émis de manière quasi colinéaire ($180^\circ \pm 0.25^\circ$) (figure 9). Ces deux photons de même énergie sont par la suite captés par les détecteurs placés en anneau autour du patient. L'information est ensuite traitée numériquement, ce qui permet de produire une image de la distribution du radiotraceur suite à son injection dans un sujet.

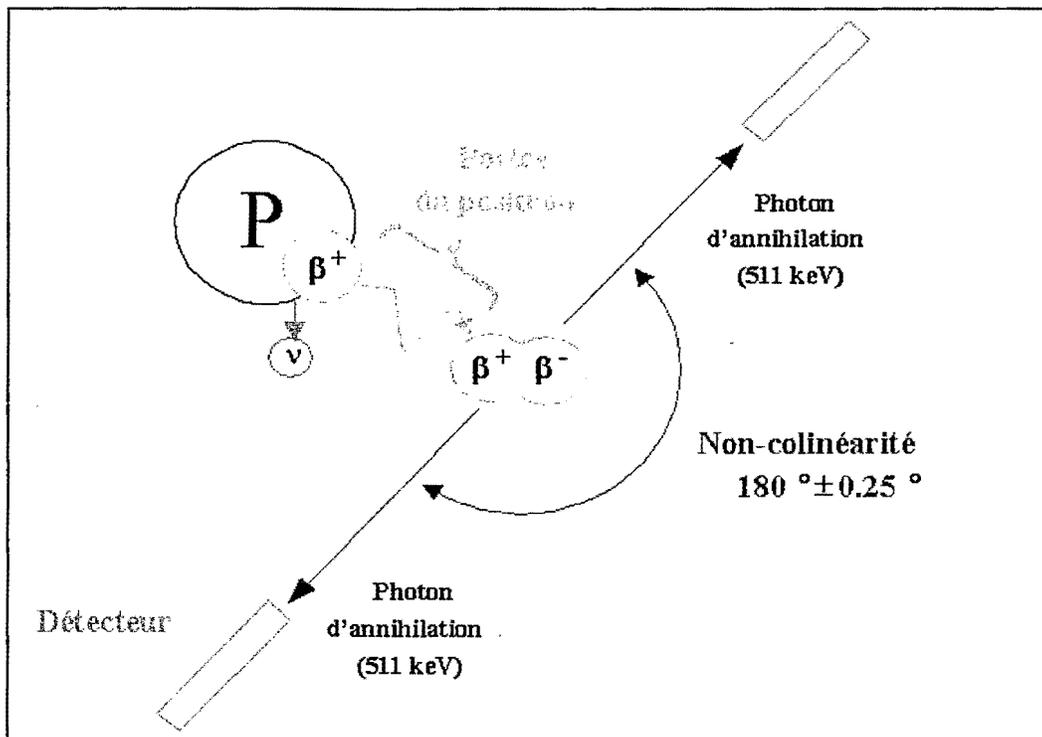


Figure 9 Processus d'émission et de détection en TEP.

Des analyses qualitatives, semi-quantitatives et quantitatives peuvent être effectuées à partir de cette image. L'analyse quantitative permet notamment la mesure de la concentration de traceur dans les tissus ainsi que leurs changements au cours du temps. Les modèles cinétiques permettent de relier la distribution de radioactivité à des paramètres d'intérêt biologique comme la perfusion, le métabolisme (glucose, acide gras, etc.), la consommation d'oxygène, la concentration de récepteurs et la vitesse de biosynthèse de protéines. Ces modèles utilisés en TEP permettent par conséquent de quantifier des processus biochimiques et physiologiques. L'utilisation de la TEP en clinique chez l'humain est de plus en plus répandue, principalement en ce qui a trait à la détection du cancer. La TEP est également couramment utilisée dans le domaine de la recherche, tant chez l'humain que chez l'animal. Le développement de nouveaux

scanners TEP de haute résolution servant aux études sur les petits animaux tels que la souris et le rat, connaît actuellement un important essor. Ces recherches permettent entre autres d'approfondir les connaissances et de mieux comprendre les voies de l'expression génétique qui codent pour des processus biologiques normaux, tels que la réplication et la communication cellulaire dans l'identification des altérations génétiques (Phelps, 2000).

4.3.1 Radionucléides émetteurs de positrons

Les radionucléides émetteurs de positrons utilisés en TEP sont généralement produits par bombardement de cibles spécifiques d'éléments stables à l'aide de protons ou de deutons accélérés à des énergies de quelques millions d'électrons volts (MeV).

Les radioisotopes les plus fréquemment utilisés en TEP, tels le fluor-18 (^{18}F), carbone-11 (^{11}C), l'azote-13 (^{13}N) et l'oxygène-15 (^{15}O), se retrouvent dans la majorité des molécules naturelles ou dans plusieurs produits pharmaceutiques. De nombreux autres émetteurs de positrons sont disponibles, ce qui permet d'avoir une grande diversité de propriétés chimiques et donc de pouvoir choisir un radioisotope en fonction du modèle biologique étudié (Tableau 1).

Tableau 1. Radioisotopes émetteurs de positrons utilisés en TEP.

Isotope	T _{1/2}	E _{β+} (MeV)	Réaction
¹⁵ O	2,1 minutes	1,74	¹⁵ N (p, n)
¹³ N	9,9 minutes	1,2	¹⁶ O (p, α)
¹¹ C	20,4 minutes	0,97	¹⁴ N (p, n)
⁶⁸ Ga	68 minutes	1,89	⁶⁸ Zn (p, α)
¹⁸ F	109,7 minutes	0,64	¹⁸ O (p, n)
⁶¹ Cu	3,4 heures	1,2	⁶¹ Ni (p, n)
⁶⁴ Cu	12,8 heures	0,66	⁶⁴ Ni (p, n)
¹²⁴ I	4,2 jours	2,15	¹²⁴ Te (p, n)

Le radioélément actuellement le plus répandu est le fluor-18 pour les applications oncologiques, tandis que ¹⁵O, ¹³N et ¹¹C sont fréquemment utilisés dans des systèmes où les cinétiques de captation sont plus courtes, comme l'imagerie cardiaque et cérébrale (Rigo et al., 1996; Tewson et Krohn 1998). D'autres radioisotopes, tels le cuivre-64 sont utilisés pour marquer des anticorps monoclonaux, des peptides ou des oligonucléotides ou dans les tissus qui demandent plus de temps d'accumulation (Wu et al., 2000). Actuellement, on est à développer de nouveaux radiotraceurs capables de se lier aux récepteurs sigmas, aux tyrosines kinases, aux cytokines et aux facteurs de croissance, Par ailleurs, on étudie également l'apport de la TEP dans le développement du médicament (Collier et al., 2002).

4.3.1.1) ¹⁸F-Fluorodéoxyglucose (FDG)

Le FDG une fois injecté dans l'organisme se comporte de manière analogue au glucose. Il est transporté à l'intérieur de la cellule par des molécules de transport du glucose (GLUT1 et GLUT3), qui se trouvent à la surface de toutes les

cellules, et plus particulièrement des cellules tumorales. Le FDG est ensuite phosphorylé par l'héxokinase en FDG-6-phosphate. Contrairement au glucose-6-phosphate qui poursuit sa voie métabolique en eau et en CO₂, le ¹⁸FDG-6-phosphate n'est pas un substrat pour les réactions subséquentes du cycle glycolytique. Il demeure essentiellement emprisonné à l'intérieur de la cellule sans subir de dégradation, ce qui permet la visualisation du tissu tumoral par la TEP (figure 10).

Suite à l'injection, le FDG se retrouve en majeure partie dans le plasma. Il est en partie éliminé par le rein, étant donné que les protéines de transport sont moins efficaces pour récupérer le FDG que le glucose. Le taux de captation de FDG est un indice qui permet de faire la différence entre une tumeur maligne et bénigne.

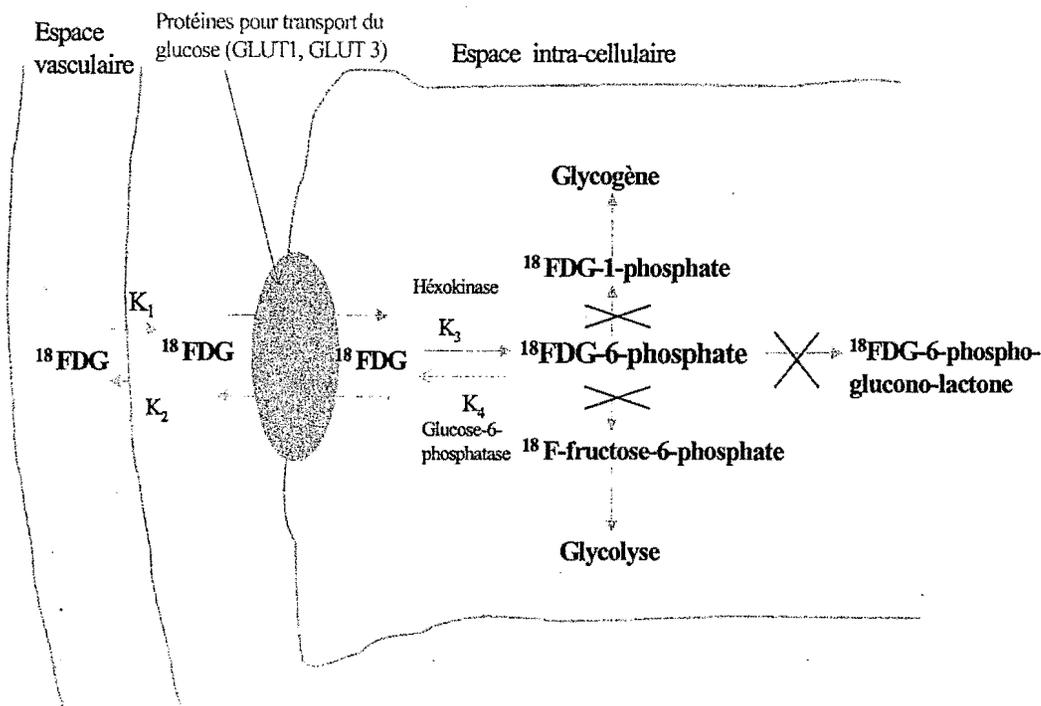


Figure 10 Métabolisme de FDG.

En ce qui concerne la tumeur mammaire primaire, l'imagerie TEP au FDG démontre une sensibilité de 90 % et une spécificité de 85 %. Des résultats similaires ont été rapportés concernant l'efficacité de détection des métastases ganglionnaires axillaires, qui constituent un facteur pronostique primordial (Dehdashti et al., 1995; Sheidhauer et al. 1996). Enfin, le FDG est maintenant utilisé pour détecter des cancers autres que celui du sein : cancers du poumon, du colon, du pancréas, etc. (Delbeke et Martin, 2001; Czernin, 2002).

4.3.1.2) 16 α - [¹⁸F]fluoro-17 β -estradiol (FES)

Le FES est sans doute l'analogue de l'œstradiol le plus prometteur à avoir été identifié. Il possède en effet une haute affinité avec les RE, une faible captation non spécifique et une bonne stabilité chimique (Kieswetter et al., 1984). Les études cliniques menées avec le FES ont permis d'imager efficacement les cancers du sein avec RE, et de déterminer avec précision la concentration en récepteurs d'œstrogène sur des métastases ganglionnaires. En plus, une excellente corrélation entre la captation du FES et la concentration en RE déterminée par la mesure *in vitro* a été démontrée (Mintun et al., 1988) (McGuire et al., 1991).

Le FES présente une structure et un comportement pharmacocinétique (e.g. capture et métabolisme rapide par le foie) similaire à celui de l'œstradiol. Une différence existe cependant entre leurs biotransformations : le métabolisme de l'œstradiol est dominé par la déshydrogénation de la fonction 17 β -hydroxyle, suivi préférentiellement par des hydroxylations aromatiques (C-2) et alicycliques (C-15

ou C-16) plutôt qu'une conjugaison. Le métabolisme du FES quant à lui, est dominé essentiellement par hydroxylation en C-2 et par une conjugaison excessive (Salford, et al., 1997). L'analyse des radiométabolites du sang et de l'urine suggère qu'ils sont essentiellement constitués de conjugués sulfates et de glucuronidates du FES (Berridge et al., 1994). Les métabolites sont polaires et négativement chargés. Ils n'ont pas la possibilité de se lier spécifiquement à la SHBG mais, par analogie avec les conjugués de l'œstradiol, peuvent certainement se fixer à l'albumine, le reste demeure sous forme libre (Pan et al., 1985). Par la suite, la partie libre du FES peut se dissocier des protéines plasmatiques pour devenir physiologiquement actives, c'est-à-dire entrer dans les cellules et se lier à leur récepteur nucléaire (figure 11).

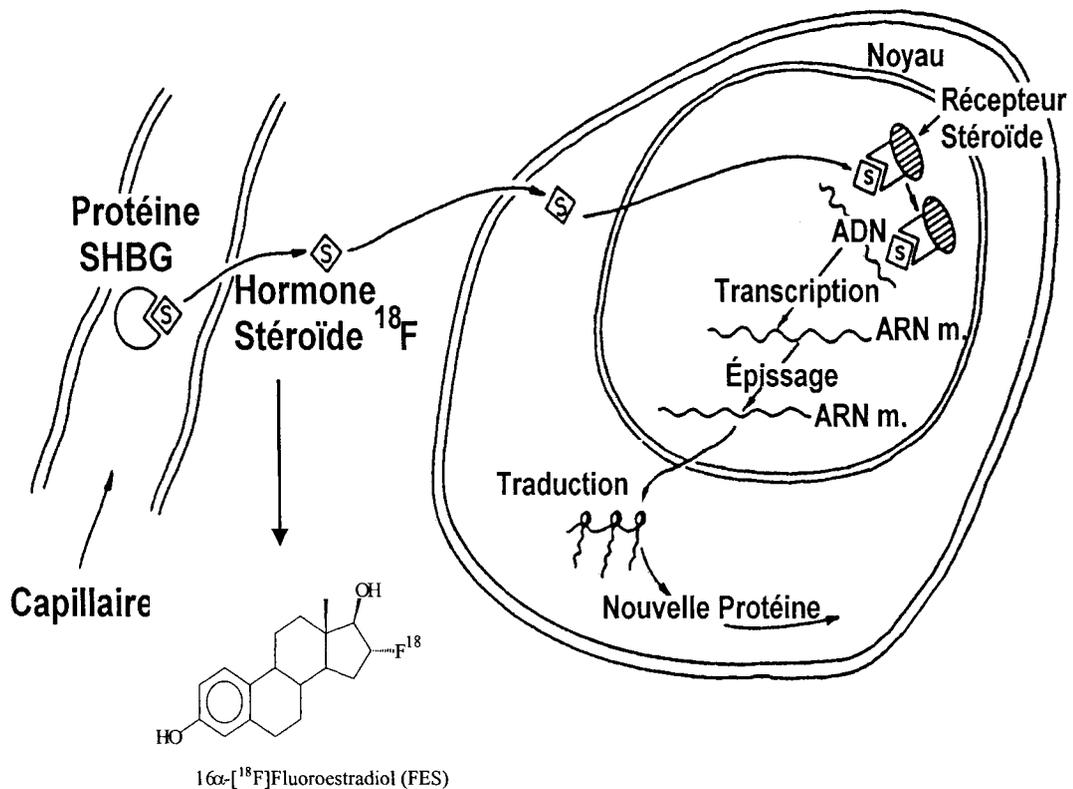


Figure 11 Mécanisme d'entrée du FES dans les cellules.

Le FES a démontré une sensibilité de 76% et une spécificité de 100% en ce qui a trait à la détection par TEP des cellules cancéreuses chez des patientes présentant un bilan métastatique connu (Montimer et al.,1996). Toutes ces études illustrent la fiabilité du FES pour évaluer la disponibilité des RE fonctionnels, prédire la probabilité de la réponse à une thérapie et connaître l'hétérogénéité intrinsèque de l'expression du récepteur à l'intérieur de la tumeur (Dehdashti et al.,1999).

5. IMAGERIE TEP ANIMALE

5.1 Description de la caméra TEP animale de l'Université de Sherbrooke

La caméra TEP animale de l'Université de Sherbrooke a été fabriquée au début des années 1990 et a été mise en opération en 1994 (Figure 12). Il s'agit d'une caméra à haute résolution, reposant sur une technologie de détection originale à base de semiconducteur, spécialement conçue pour imager de petits animaux de laboratoire comme le rat ou la souris.

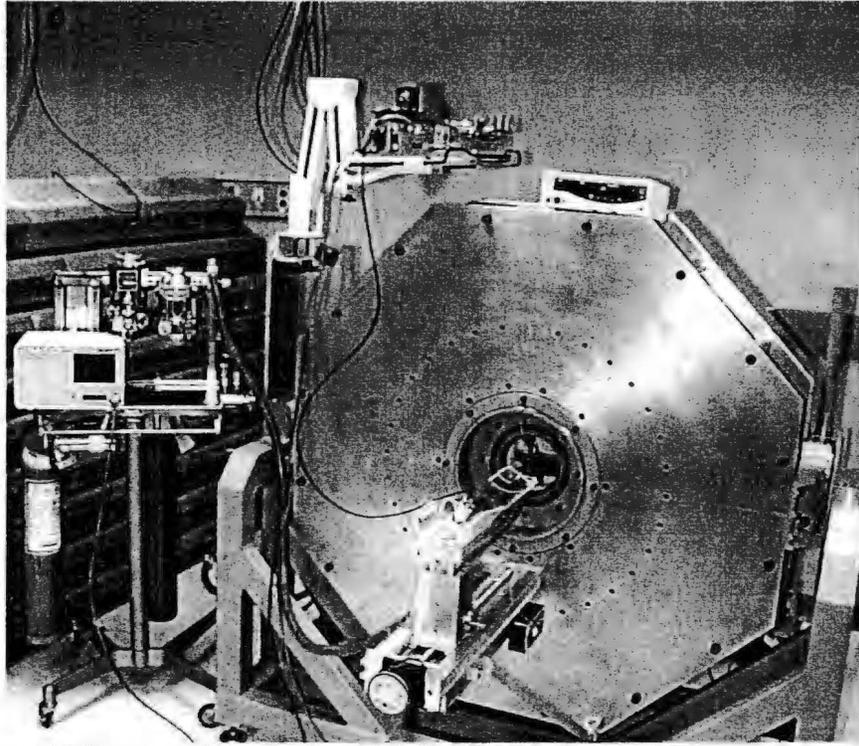


Figure 12 Tomographe animale de l'Université de Sherbrooke.

Le système de détection de la caméra TEP animale est formé de deux anneaux, adjacents et identiques, comportant chacun 256 détecteurs. Chaque détecteur est composé d'un cristal de germanate de bismuth (BGO) de $3 \times 5 \times 20$ mm³ couplé individuellement à une photodiode à avalanche. Le diamètre du champ radial utile à l'imagerie est de 118 mm et la dimension du champ axial est de 10,5 mm. (Lecomte et al., 1994). Au centre du champ, la caméra atteint une résolution spatiale transaxiale de 2.1 mm et axiale de 3.1 mm, soit une résolution volumique de 14 μ l. Grâce à son système de détection à voies indépendantes et à son champ très bien collimaté, cette caméra atteint un taux de comptage effectif très élevé, malgré une efficacité de détection très faible de seulement 0.5% (Lecomte et al., 1996). Ces caractéristiques en font un appareil très bien adapté aux études

dynamiques rapides avec les radiotraceurs non-spécifiques usuels qui peuvent généralement être administrés sans restrictions de doses.

5.2 Étalonnage de la caméra TEP animale

5.2.1 Mires d'étalonnage

Le volume des tumeurs étant variable et de dimension se rapprochant de la résolution spatiale de la caméra TEP, nous avons dû trouver le facteur de correction pour l'effet du volume partiel. Pour ce faire, nous avons préparé différents ballons de volume variable (13 μl à 1000 μl), qui ont servi de mires d'étalonnage. Toutes les mires, qui contenaient la même concentration de FDG, ont été préparées à partir d'une même solution de 10 ml de FDG contenant 34.5 MBq (932 μCi) et ont été mesurées individuellement pendant 20 minutes.

Dans le but d'évaluer l'effet du taux de comptage, nous avons aussi préparé 3 mires de volume différent (60 μl , 130 μl et 500 μl) contenant toutes la même concentration mesurée en Bq/ μl ou $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$. Les concentrations de FDG dans les mires ont ensuite été mesurées à différents intervalles de temps sur une période d'environ deux demi-vies du ^{18}F (0 min, 30 min, 60 min, 120 min, 150 min, 180 min et 210 min) et donc à différents taux de comptage. Chaque mire a été mesurée individuellement pendant 10 minutes.

Nous avons quantifié les effets du volume partiel et de taux de comptage en obtenant les valeurs de captation standardisées (Standardized Uptake Value ou SUV) exprimées en SUV_{max} , SUV_{mean} et SUV_{4pix} . Ces valeurs ont été obtenues à partir des régions d'intérêt, ou ROI, 2D (une seule tranche de la mire) et 3D (tout le volume de la mire) pour le volume partiel, et 3D pour le taux de comptage. L'analyse des données a été faite grâce au programme d'analyse LabTEP Sherbrooke v.1.2.5 (2003), qui a été développé dans notre département par E. Rousseau sous supervision du Dr F. Bénard.

5.2.2 Définition du concept de valeurs de captation standardisées ou « Standardized Uptake Value » (SUV)

Le SUV est un indice permettant de mesurer de façon semi-quantitative la captation d'un radiotracteur. Pour déterminer le SUV, il faut préalablement calibrer la caméra et corriger l'atténuation (mesure de la transmission), puis le volume partiel pour les petites structures et les régions d'intérêt (ROI) (H.Vesselle et al., 2000). Le SUV est défini comme :

$$SUV = \frac{\text{Concentration du traceur (KBq/ml)}}{\text{Activité injectée (KBq) / Poids (g)}}$$

où la concentration du traceur est estimée à partir des images TEP et le poids représente le poids corporel de l'animal.

5.2.3 Évaluation des effets du volume partiel et de taux de comptage

Tout d'abord nous avons vérifié s'il existait une différence entre les SUV_{max} et les SUV_{mean} des ROI 2D et 3D. Nous avons trouvé, comme le montre la figure 13, qu'elles ne différaient pas de façon significative.

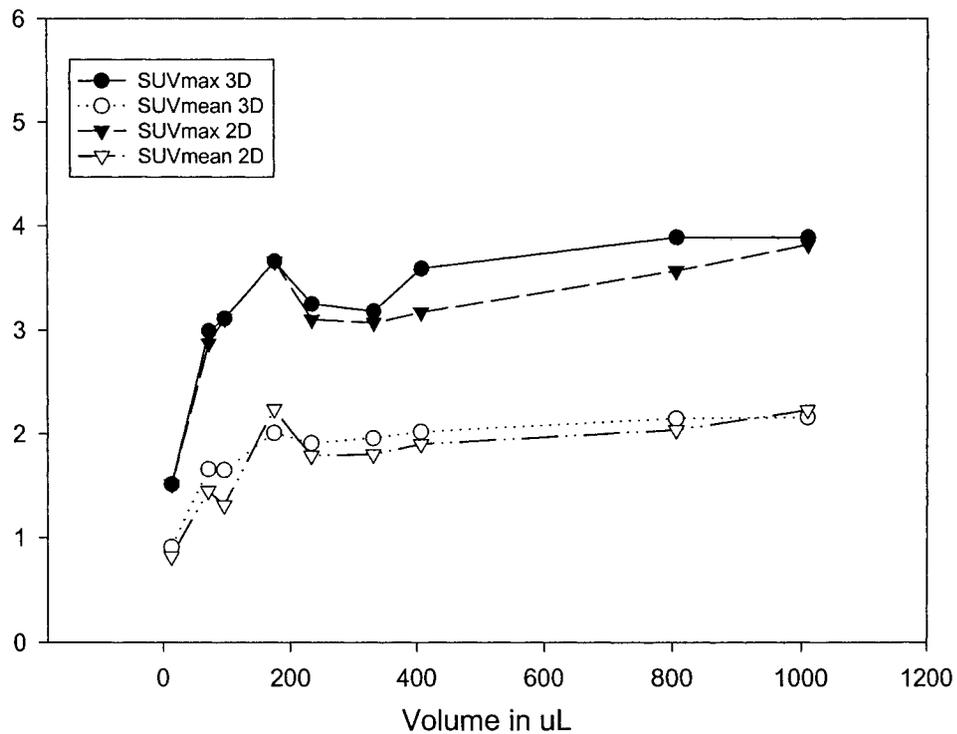


Figure 13 Comparaison entre les SUV_{max} et SUV_{mean} correspondant aux ROI 2D et 3D.

À partir des mesures de SUV, nous avons calculé les facteurs de correction du volume partiel selon les étapes suivantes :

Étape 1

On ajuste les valeurs de SUV selon l'équation (éq-1) pour obtenir les paramètres A,B et C.

$$(éq 1) \quad Y1 = \frac{A \cdot X}{(1 + (X/B)^C)^{1/C}}$$
$$Y1 = SUV$$

X = Volume des mires en mm³

Étape 2

Les valeurs de SUV sont normalisées par rapport aux paramètres A et B
(éq 2) $Y2 = Y1/(A*B)$

Étape 3

Les valeurs de SUV normalisées (Y2) sont à nouveau ajustées selon l'équation (éq-1) afin d'obtenir les valeurs finales de A, B et C

(éq 1) $Y2 = (A*X)/((1+(X/B)^C)^{(1/C)})$
Résultats : A, B et C

Note : en pratique, les étapes 2 et 3 peuvent être omises puisque les nouvelles valeurs de B et C sont les mêmes que celles de que nous avons obtenues précédemment.

Étape 4

Calcul du facteur de correction : F_c
(éq-3) $F_c = 1/[(A * X)/((1+(X/B)^C)^{(1/C)})]$

Étape 5

Correction du volume partiel :
(éq-4) SUV corrigés relatives au volume partiel = SUV mesuré * F_c

Les paramètres de correction sont présentés dans le tableau suivant :

Table 2 Paramètres de correction pour le volume partiel.

	Paramètres			
	SUV _{max}	SUV _{mean}	SUV _{4pix}	R ²
A	0.0649	0.0856	0.0274	0.96
B	15.31	11.68	36.44	0.99
C	0.842	0.720	1.338	0.97

1. Les facteurs de correction sont calculés selon : $F_c = 1/[(A * X)/((1+(X/B)^C)^{(1/C)})]$

La figure 14 permet de comparer les valeurs SUV des mires corrigées et non corrigées relatives au volume partiel.

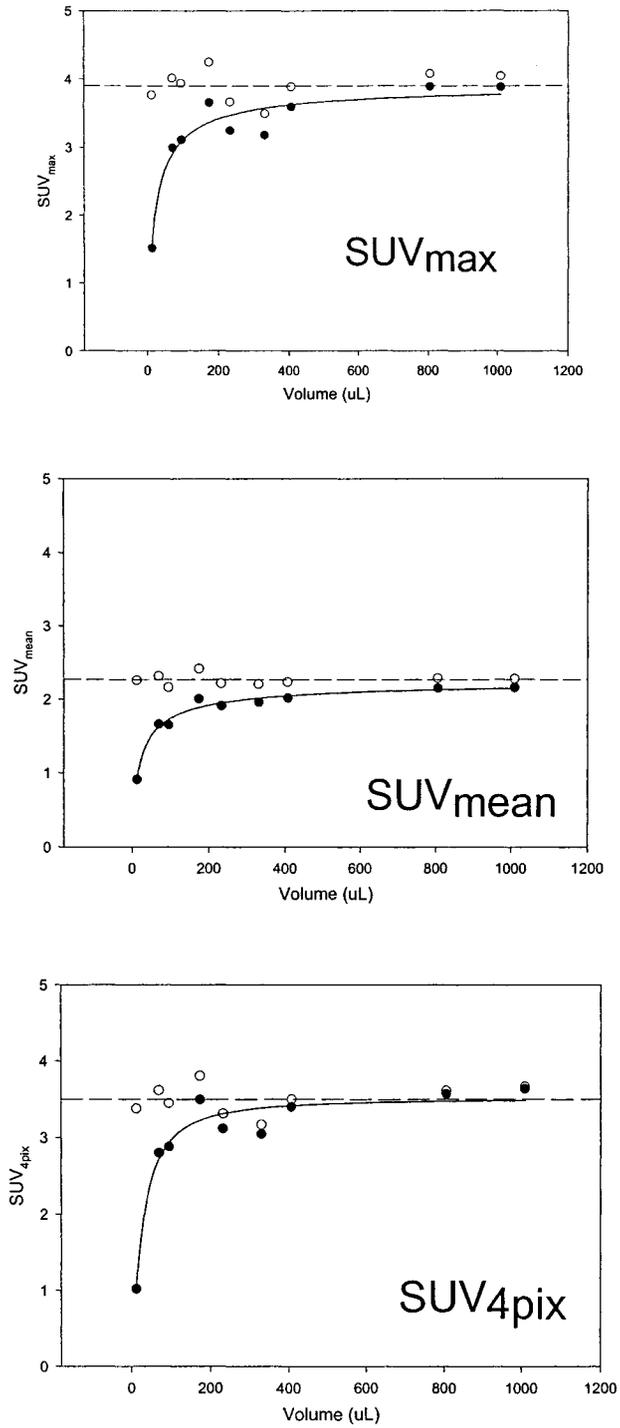


Figure 14 Valeurs de SUV relatives aux mires avant (●) et après (○) correction pour le volume partiel. Moyenne des SUV corrigées (- -).

Suite à l'analyse des mesures prises pendant 3,5 heures et présentées à la figure 15, nous avons constaté que la sensibilité de la caméra TEP était indépendante de l'activité présente dans le champ. Autrement dit, après correction du volume partiel, nous n'avons pas observé de différence significative entre les SUV mesurées par la caméra TEP à différents intervalles de temps et pour différents volumes.

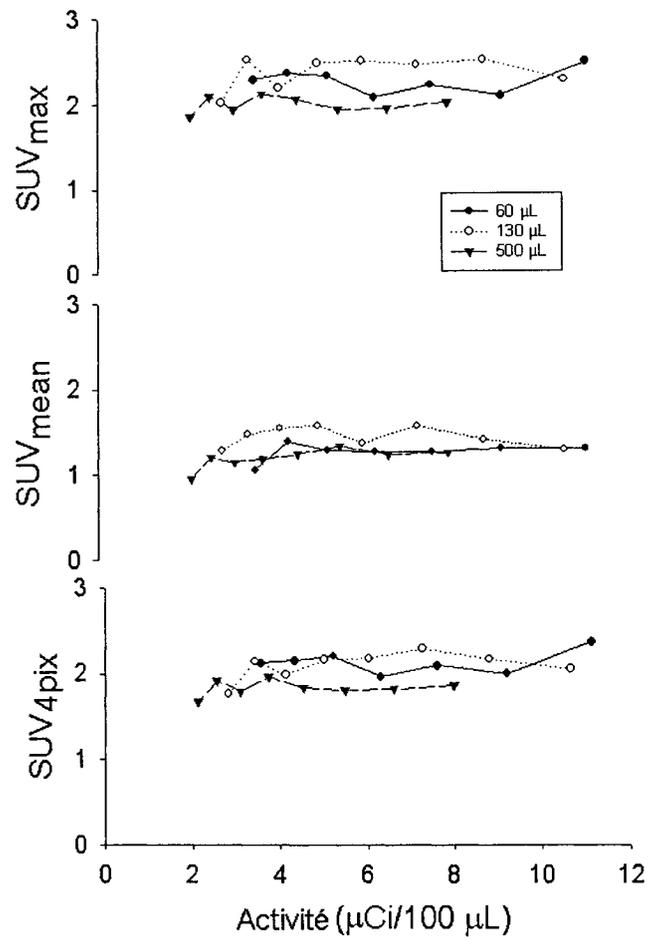


Figure 15 Effet de taux de comptage sur la réponse de la caméra, après correction du volume partiel.

5.3 Procédures relatives à l'analyse des images

Les SUV_{4pix} ont été choisis comme base de calculs du pourcentage de dose injectée par gramme (%) parce qu'ils sont moins sensibles que les SUV_{mean} à la délimitation des ROI et plus résistants aux variations aléatoires de l'activité des pixels que les SUV_{max} . Nous avons aussi noté que la corrélation était meilleure entre les SUV_{max} et les SUV_{4pix} par rapport à leur corrélation avec les SUV_{mean} (figure 16).

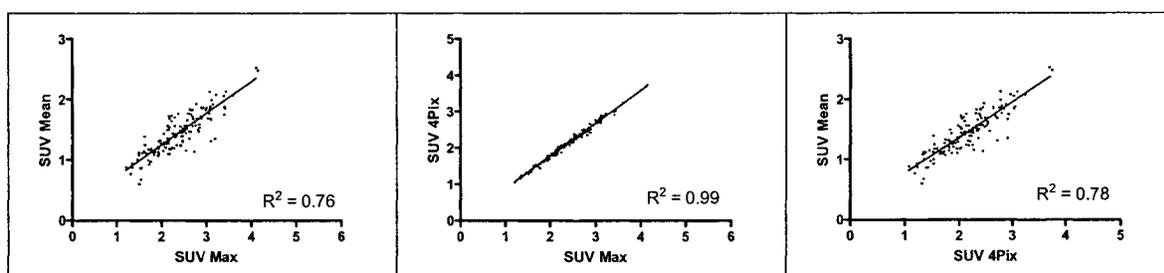


Figure 16 Corrélation entre différentes méthodes pour évaluer les SUV.

5.4 Exemples d'application de l'imagerie TEP à haute résolution

1. L'imagerie TEP permet d'évaluer le métabolisme tumoral en mesurant la consommation de glucose des cellules tumorales à l'aide du FDG. Cette approche peut ainsi être utilisée pour évaluer l'efficacité d'un traitement ou pour étudier les mécanismes d'action de diverses thérapies. À la figure 17, nous présentons un exemple où l'imagerie TEP est exploitée pour étudier la réponse à la thérapie photodynamique d'un modèle de tumeur implantée chez le rat. Une phthalocyanine d'aluminium a été injectée 24 heures avant de prendre les images TEP. Une dose d'environ 2 mCi de FDG a été infusée durant toute la durée de l'imagerie, soit 2 heures. Enfin, pendant ces 2 heures, un traitement par irradiation a été effectuée.

Nous remarquons que la tumeur traitée par thérapie photodynamique a accumulé moins de FDG en comparaison de la tumeur contrôle, ce qui démontre l'efficacité du traitement.

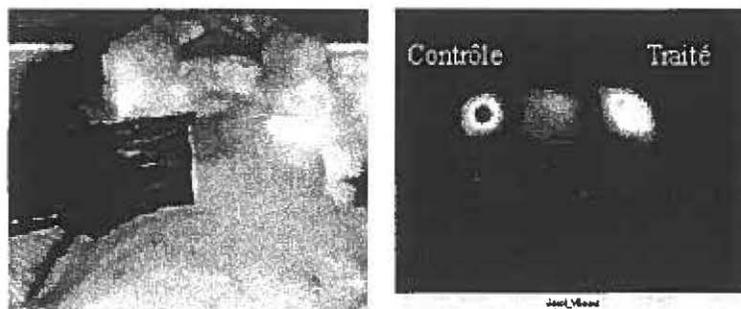


Figure 17 Thérapie photodynamique en temps réel (courtoisie de V. Bérard).

2. Imagerie TEP en cardiologie, à la figure 18 nous avons une image de la partie ischémique du cœur de rats prise une semaine après la ligature proximale et distale de leur artère coronaire gauche. Les images ont été prises une heure après l'administration intraveineuse de 1,5 mCi de FDG. (A) Ligature proximale de l'artère coronaire gauche qui cause un déficit important de captation du FDG dans les segments antérieur et latéral du myocarde gauche, tel que confirmé par l'importante zone de nécrose de la région correspondante dans la coupe histopathologique. (B) Ligature distale de l'artère coronaire gauche démontrant un déficit de captation limité du segment antéro-latéral, confirmé par quelques dommages nécrotiques dans la coupe histo-pathologique.

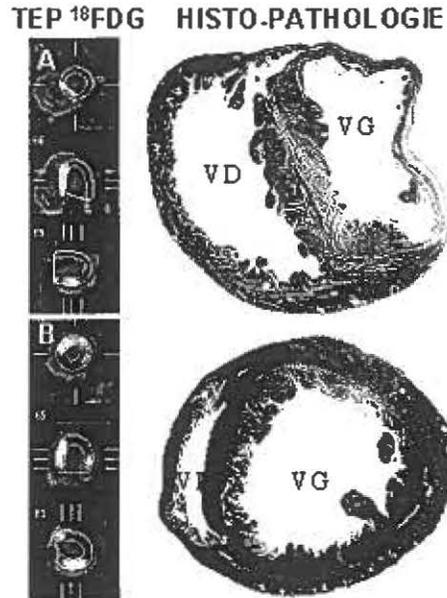


Figure 18 Images TEP au FDG, du ventricule gauche (VG) et droit (VD) prise une semaine après la ligature de l'artère coronaire gauche et coupes histologiques correspondantes.

3. Imagerie TEP des récepteurs d'œstrogènes (RE) chez des souris porteuses de carcinomes mammaires RE+ (MC4-L1 et MC7-L2). La figure 19 en (A) a été obtenue après injection de FDG (500 μ Ci) qui est un marqueur de l'activité métabolique de la tumeur, et en (B) nous avons une image de la captation du FES (400 μ Ci) par les RE tumoraux. Ces images ont été prises une heure après l'injection du radiotraceur.

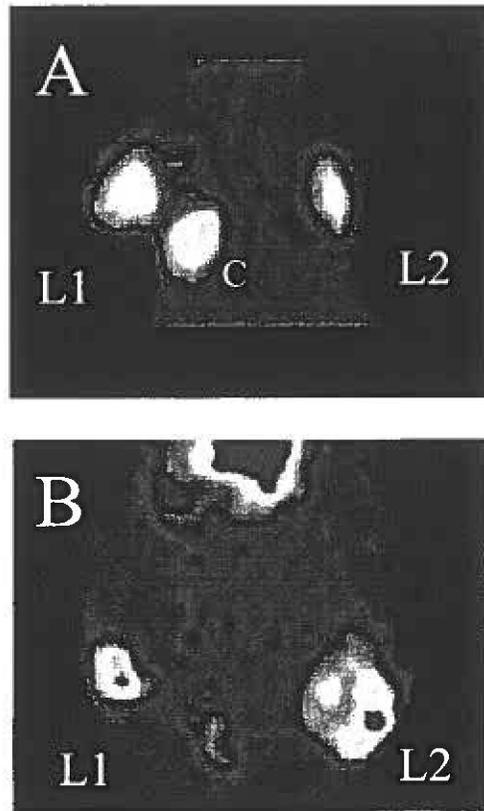


Figure 19 Imagerie de tumeurs mammaires RE+ chez la souris. (A) accumulation de FDG, (B) captation du FES par le RE. Légende : L1 = MC7-L1; L2 = MC4-L2; C = cœur.

II. ARTICLE I

Breast cancer models to study the expression of estrogen receptors with small animal PET imaging.

Antonio Aliaga, Jacques A. Rousseau, René Ouellette, Jules Cadorette, Johan E. van Lier, Roger Lecomte et Francois Bénard.

Nuclear Medicine and Biology vol. 31, no. 6, pp. 761-770, août 2004.

La présente étude expose les étapes et les résultats associés à la sélection d'un modèle animal de tumeur mammaire avec RE que nous avons retenu pour étudier les effets des agents d'hormonothérapie et chimiothérapie. Grâce à ces recherches, de nouveaux radiotraceurs et de nouveaux agents thérapeutiques peuvent être évalués à l'aide de l'imagerie TEP. Pour identifier ces modèles, nous avons comparé des lignées d'adénocarcinomes humains avec des lignées de carcinomes murins. Les adénocarcinomes croissent lentement et ont tendance à perdre leurs RE *in vivo*, ils n'ont donc pas été retenus. Par contre, les carcinomes de souris qui retiennent leur RE *in vivo*, croissant bien et permettent d'obtenir d'excellentes images par TEP aussi bien avec le FES que le FDG. Ils ont été retenus comme étant le modèle le plus approprié pour l'utilisation avec la TEP.

Breast cancer models to study the expression of estrogen receptors with small animal PET imaging

Antonio Aliaga, Jacques A. Rousseau, René Ouellette, Jules Cadorette, Johan E. van Lier, Roger Lecomte and Francois Bénard*

Metabolic and Functional Imaging Center, Department of nuclear medicine & radiobiology, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

Abbreviated Title: Small animal PET imaging of estrogen receptors.

Key words: Positron emission tomography; PET; small animal PET; estrogen receptor; breast cancer; radiopharmaceutical

* Corresponding author:

François Bénard, MD
Department of Nuclear Medicine & Radiobiology
Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke
3001, 12th Ave N.
Sherbrooke, QC, Canada J1H 5N4
Phone: (819) 346-1110 ext. 11865
FAX: (819) 820-6490
E-mail: francois.benard@USherbrooke.ca

Abstract

Different animal models of estrogen positive tumors (ER⁺) were evaluated for their suitability to follow tumor response after various treatment protocols, using small animal positron emission tomography (PET). ER⁺ human breast cancer cell lines MCF-7 and T-47D, using MDA-MB-231 as ER⁻ control, and murine mammary ductal carcinomas MC4-L2, MC4-L3 and MC7-L1, were compared for their *in vivo* growth rate and retention of ER⁺ status. Tumor metabolic activity was estimated from the relative uptake (% injected dose/g) of [¹⁸F]fluorodeoxyglucose (FDG) uptake, while ER content was determined from 16 α -[¹⁸F]fluoroestradiol (FES) retention. F-18 activity values were obtained by small animal PET imaging and confirmed by tissue sampling and radioactivity counting. Reliable uptake measurements could be obtained for tumors of 200 μ l or over. The human cell lines grew at a slower rate *in vivo* and failed to accumulate FES; in contrast, the Balb/c MC7-L1 and MC4-L2 grew well and showed good uptake of both FDG and FES. Chemotherapy and hormone therapy delayed the growth of MC7-L1 and MC4-L2 tumors, confirming their suitability as an ER⁺ model for therapeutic interventions. MC4-L3 tumors also showed promising results but required the presence of progestative pellets to grow. These data demonstrate that murine MC7-L1 and MC4-L2 tumors are suitable models for the monitoring of ER⁺ breast cancer therapy using small animal PET imaging.

1. Introduction

For the proper management of breast cancer patients, knowledge of the status of the tumor estrogen receptors (ER) is of utmost importance [1-3]. PET imaging of metabolic activity in breast tumors with [^{18}F]fluorodeoxyglucose (FDG) is now a well-established procedure [4], and FDG-PET can be used to monitor tumor response to therapy [5-9]. The ability to predict whether a patient is likely to respond to hormone therapy prior to the initiation of treatment would be beneficial in instances where the ER status of breast tumors is unclear, such as in cases of recurrent or metastatic breast cancers inaccessible to biopsy or in the presence of multiple sites of disease involvement. Estrogen receptor imaging with PET or SPECT are potential tools being evaluated for this purpose in several centers [10]. In spite of the availability of such advanced imaging techniques, the time course and modulation of ER during breast cancer therapy remains poorly understood. Studies on the effect of cancer therapy on tumor cell survival and ER status either require invasive methods with limited time sampling [11] or have been conducted *in vitro* [12, 13]. Conventional animal biodistribution studies allow for more control over experimental conditions but require that different animals be sampled during the course of therapy. With high-resolution small animal positron emission tomography (SA-PET) the same animal can be followed throughout the therapeutic process thus reducing experimental variation while requiring fewer animals. The Sherbrooke avalanche photodiode SA-PET was developed to fulfill these needs [14, 15] and has been used extensively for cardiac studies and tumor monitoring in rats and mice [16, 17].

In this study, FDG and 16α -[^{18}F]fluoroestradiol (FES) were used in conjunction with the SA-PET camera to investigate several ER⁺ xenografts and mouse tumor cell

lines as possible models for ER⁺ breast cancer. The data obtained from PET imaging were validated by conventional biodistribution studies while the ER status of the tumors was confirmed by *in vitro* assays and by *in vivo* competition with non-radioactive estradiol.

2. Materials and Methods

2.1 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 (Ebco, Vancouver, BC, Canada). For the synthesis of FDG and FES, we used established procedures [18, 19].

2.2 Tumor models

The human ER⁺ breast cancer cell lines MCF-7, T-47D and MDA-MB-231 (ER⁻, control) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia). The MCF-7 and T-47D cells were maintained in culture in T75 flasks in RPMI medium 1640 with L-glutamine, penicillin 100 µg/ml, streptomycin 100 µg/ml and 10% calf serum (GibcoBRL, Life Technologies). The MDA-MB-231 cells were maintained in T75 flasks in DMEM (with penicillin, streptomycin and glutamine) and 10% calf serum [20-22].

Murine ER⁺ mammary ductal carcinoma MC4-L2, MC4-L3 and MC7-L1 tumor cells were generously provided by the Instituto de Biología y Medicina Experimental, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas en Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina [23]. The cells were grown in T75 flasks in DMEM/F-12 with 15 mM HEPES buffer, L-glutamine, penicillin 100

$\mu\text{g/ml}$, streptomycin 100 $\mu\text{g/ml}$, 10% FBS (Gibco BRL, Life Technologies) and 10 nM Medroxy Progesterone Acetate (MPA) (Sigma Chemicals, Ontario, Canada).

The receptor content of the cell lines was measured by competitive binding with ^3H -estradiol, using a whole cell assay [13, 24]. These assays were conducted in phenol free RPMI Medium 1640 containing 10% calf serum stripped from endogenous estrogen with activated charcoal.

2.3 Animals

The animal experiments were conducted in accordance with the recommendations of the Canadian Council on Animal Care and the in-house Ethics Committee for Animal Experiments. The human ER⁺/ER⁻ cell lines MCF-7, T47D and MDA-MB-231 were inoculated (1×10^7 cells, I.D.) on the flank of 4-5 weeks old oophorectomized athymic (nude) mice (CrI:CD-1-*nu*BR; Charles River, Montréal, Québec, Canada). In later experiments non-oophorectomized mice were used. Estrogen pellets (1.7 mg, Innovative Research of America, Florida, USA) were implanted a week prior to tumor cell inoculation and left in place until the tumors reached a size sufficient for imaging (~60 days). The pellets were surgically removed at least 3 days prior to administration of FDG or FES. In some animals the estrogen blood level was monitored following pellet removal. Mice mammary tumor cell lines MC4-L2, MC4-L3 and MC7-L1 were inoculated subcutaneously (1×10^7 cells) on the thigh of Balb/c mice (15-20 grams). MC4-L3 tumors were grown in the presence of MPA (40 mg, Innovative Research of America, Florida, USA) implanted subcutaneously. All invasive procedures were done while the animals were under anesthesia (1 ml/kg i.m. of a solution containing 13 mg of Ketamine and 86 mg of Xylazine per ml). Tumor size was measured on a weekly basis and

computed using the ellipsoid formula as follow: $V_{\text{mm}^3} = \text{width} \times \text{length} \times \text{thickness} \times 0.524$ [25].

2.4 PET Imaging

Images were acquired using the Sherbrooke avalanche photodiode SA-PET scanner [15, 26], which is able to achieve a 14 μl volumetric resolution (2.1 mm FWHM transaxial)[14]. Prior to imaging, the camera was calibrated with a phantom filled with water containing 18.5 MBq (500 μCi) of FDG in a volume appropriate for a mouse (15 ml). Mice were imaged 6 to 7 weeks following tumor inoculation at which time tumor size had reached more than 200 μl . Imaging was performed while the animal was under Isoflurane anesthesia (1% at 2 l/min oxygen flow). During imaging, the animal was placed supine on the bed of the camera and kept warm with a heating pad. Imaging was initiated 1-h after the i.v. administration of either 18.5-22 MBq (500-600 μCi) of FDG in 200-400 μl of normal saline or 7.4-11 MBq (200-300 μCi) of FES formulated in 200-400 μl of 10% ethanol in physiological saline. Three bed positions were acquired with radial (clam shell) and axial double sampling mode. The images were reconstructed using 25 iterations of the maximum likelihood expectation maximization (ML-EM) algorithm implementing position-dependent detector response[27]. Overall, 18 slices (6 per bed position) in 128 x 128 pixels format were obtained, covering 24.75 mm axially. The images were interpolated across the axial planes to a final matrix size of 128 x 128 x 54 with voxel sizes of 0.475 mm x 0.475 mm x 0.458 mm. The maximum and average uptake values were expressed as the percentage of the injected dose per gram of tissue (%ID/g), calculated with the Sherbrooke LabTEP software developed in-house using regions of interest (ROI) drawn around the tumors.

2.5 Biodistribution

At 2.5-h post-injection the animals were sacrificed under deep Ketamine-Xylazine anesthesia by severing the axillary artery to collect blood, followed by opening of the thoracic cavity and removal of the heart. The tissues of interest were removed, rinsed with saline, blotted dry and placed in pre-weighted tubes. The radioactivity was counted in a Packard Cobra II Auto-gamma counter, corrected for decay and expressed as a percentage of the injected dose per gram of tissue (% ID/g). To validate the receptor mediated uptake of FES, some animals were co-injected with 20 µg of unlabeled estradiol.

2.6 Immunocytochemistry

The estrogen and progesterone receptors content of the MCF-7 tumors were visualized by immunocytochemistry. After fixing in 10% formol saline, the tumors were embedded in paraffin blocks and serially cut at 3 µm. Paraffin was removed by successive washings in toluene and alcohol. The tumor slices were then conditioned with 3% H₂O₂ for 15 min and then washed in H₂O for 5 min. To block non-specific binding, the tumor slices were incubated for 15 min with normal rabbit serum. The tissue was then incubated for 30 min at 37°C with Anti-human ER or PR antibodies (Dako, Dakocytomation, Mississauga, Ontario, Canada) diluted 1:125, 1:25 in PBS followed by washing in PBS for 10 minutes. The tumor slices were then put in the presence of antimurine antibody (Immunon, Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canada) for 20 min and washed in PBS for 10 min. Kwik streptavidin-peroxidase reagent (Immunon, Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canada) was then applied for 15 min and the slices were

again washed in PBS for 10 min. The color was developed by 3 min incubation with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) solution followed by counterstaining with hematoxylin.

2.7 Treatment protocols

At day-21 after tumor cell (MC7-L1, MC4-L2) inoculation, different groups of mice were treated for 28 days with different chemotherapy and hormone therapy regimen (i.e. antiestrogens, aromatase inhibitors). Doxorubicin (Faulding Canada., Montreal, Quebec, Canada) was injected I.V. at a dose of 10 mg/kg/week and Methotrexate (Faulding Canada, Montreal, Quebec, Canada) a 12 mg/kg/week (n=4). Tamoxifen (GenPharm, Etobicoke, Ontario, Canada) and Raloxifene (Eli Lilly, Danforth, Ontario, Canada) were given orally at a dose of 8 and 16 mg/kg/day (n=6). Exemestane was given orally at a dose of 5 and 25 mg/kg/day (Pharmacia Canada, Mississauga, Ontario, Canada) (n=6) and Letrozole at 5 mg/kg/day (Novartis Pharma Canada, Mississauga, Ontario, Canada) (n=8). Controls (n=13) without oral drug administration and controls receiving vehicle only (n=5), i.e. methylcellulose 0,7%, simple syrup (sucrose) 26,4%, sodium benzoate 0,14% (HSC), were also studied. The oral administration was done at 9 a.m. for all groups. Each week, the tumor sizes were measured with a digital caliper.

2.8 Statistical analysis.

The standard error of the mean (sem) was used to estimate the spread of data around the mean. Growth rate and radioactivity uptake in the different tumor types was compared with an analysis of covariance (ANCOVA), the covariate being the tumor size at the time of treatment initiation, day 3, with a probability (p) value of 0.05 considered statistically significant. Statistical calculations were performed using the SPSS 12.0 software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

3. Results

The MCF-7, T-47D, and MDA-MB-231 (ER⁻ control) human breast cancer xenografts and the murine, mammary tumor MC7-L1 and MC4-L2 cell lines were evaluated as possible models for the imaging of ER⁺ tumors. Prior to their inoculation, the estrogen receptor content of each cell line was assessed by competitive binding with ³H-Estradiol. The highest concentration of estrogen receptor was found in the murine cell line, MC4-L2 (530 fmol/μg DNA, sem 132) followed by MC7-L1 (217 fmol/μg DNA, sem 33), T-47D (113 fmol/μg DNA, sem 8), MC4-L3 (85 fmol/μg DNA, sem 9) and MCF-7 (78 fmol/μg DNA, sem 9). As expected, MDA-MB-231 cells were devoid of estrogen receptors.

Once inoculated the growth of the tumors was followed for 18 weeks (Figure 1). The murine cell lines (MC7-L1, MC4-L2, MC4-L3) reached imaging size (250 mm³) within 6 to 8 weeks. The growth of the MCF-7 and T-47D xenografts in NU/NU mice was however much slower than what was expected from published data [22, 28] considering that after 10 weeks, the size of these tumors was not exceeding 200 mm³. The MDA-MB-231 grew somewhat faster but 10 weeks elapsed before the tumors reached a size sufficient for PET imaging. Similar results were obtained when non-oophorectomized mice were used.

The metabolic activity and the estrogen receptor content of the tumors were measured using the SA-PET scanner with FDG and FES respectively. The xenografts and murine tumors accumulated FDG and FES in proportion to their growth rate and ER content as shown in Tables 1 and 2. Murine tumors accumulated FDG and FES in concentrations exceeding that of the reference tissue and were readily imaged by PET

(figure 2). The FES uptake (expressed as %ID/g) of the MC4-L2 tumor was higher than that of the MC7-L1 tumor ($p < 0.05$), which was consistent with the higher estrogen receptor content measured *in vitro* for this cell line. Uptake measurements in tumors correlated well between data obtained from imaging and dissection studies ($r = 0.80$, figure 3). The FDG uptake was not determined for the MC4-L3 ($n=1$) and T-47D ($n=1$) tumors. The MCF-7 and MDA-MB-231 xenografts also concentrated FDG in higher concentration than the reference tissue but showed no uptake of FES, indicating a lack of, or low concentration of ER receptors. To rule out possible interference from estradiol released by the implanted pellet, blood estradiol concentration was measured up to 9 days after removal of the pellet (Figure 4). Three days after the removal of the pellets the plasma estradiol concentration was within normal limits. Since imaging always took place more than 9 days post removal of the pellet, interference with tumor FES uptake was avoided. The loss of estrogen receptor by the MCF-7 tumor was further confirmed by histochemical staining (Figure 5). It was estimated that 85% of the cells no longer expressed ER *in vivo*.

To validate the results of the FES images, the tissues of interest were removed and counted for their radioactivity concentration (Table 3). The biodistribution of FES was found to be similar in both strains of mice and the obtained %ID/g values were comparable to those reported in the literature [29-31] although blood, muscle and fat accumulated more radioactivity than expected. To ascertain that the uptake was receptor mediated, groups of mice were co-injected with unlabeled estradiol.

The tumor-to-blood, -uterus and -nontarget tissue (muscle, fat, bone) ratios are presented in Table 4. For both groups of mice, there was high uptake in the liver

reflecting active metabolism of FES in this organ. In Balb/c mice the concentration of FES in fatty tissue, uterus and blood exceeded that of the nude mice. The ovarian activity of the nude mice on the other hand was twice that found in Balb/c mice. The murine tumors reached higher FES uptake as compared to the xenografts. Both groups of cell lines however, shared similar tumor-to-blood and -nontarget tissue ratios. In the case of the human cell lines, this was related to a faster blood clearance in the nude mice rather than to an elevated uptake in estrogen receptor-rich tissues.

The MDA-MB-231 xenograft, which is devoid of ER, reached lower tumor-to-blood and tumor-to-nontarget tissue ratios as compared to the other cell lines. In the presence of unlabeled estrogen, we noticed a significant drop ($p < 0.05$) of FES uptake by the uterus (NU/NU: -80%, Balb/c: -94%), brain (NU/NU: -53%, Balb/c: -60%), fat (NU/NU: -72%, Balb/c: -75%), ovaries (Balb/c: -69%, MC7-L1: -77% and MC4-L2: -76%). Estradiol competition data are not available for the MCF-7 and T-47D xenografts. The MDA-MB-231 tumors, devoid of ER, did not show a significant change in FES retention upon co-injection with unlabeled estradiol.

The response of the MC7-L1 and MC4-L2 tumors to therapeutic interventions with ER blockers, aromatase inhibitors and cytotoxic drugs was investigated. The results are presented in Figure 6. Letrozole, Raloxifene (8 mg/kg/day) and Doxorubicin were found to significantly ($p < 0.05$) reduce the tumor growth rate for both tumor models. For the other drugs the responses varied according to the tumor model, Exemestane (5 mg/kg/day), Tamoxifen (8 mg/kg/day) and Methotrexate (12 mg/kg/week) being effective ($p < 0.05$) in MC7-L1 whereas Raloxifene (16 mg/kg/day) worked well with MC4-L2 tumors but not in MC7-L1. The aromatase inhibitor Letrozole (5 mg/kg/day)

was effective in blocking tumor growth in both tumors models. Exemestane (5 mg/kg/day) treatment was only effective for the MC7-L1 tumors but at higher doses, this drug failed to stop tumor growth. A similar effect was observed when Tamoxifen was used to block the ER receptors: at low doses 8 mg/kg/day the tumor growth rate was stopped but not at 16 mg/kg/day. With Raloxifene an increase in dose resulted into a more pronounced inhibition of tumor growth for the MC4-L2 cells but not for the MC7-L1. Methotrexate and Doxorubicin were both effective in stopping tumor growth with Doxorubicin being the most effective drug. The tumor size of the animals receiving only the vehicle was similar to that of the control group.

4. Discussion

The management of ER⁺ breast cancer involves various protocols to block the access of estrogen to its receptor or to reduce the production of endogenous estrogens [32]. Recently, Mortimer and colleagues suggested using the increase in FDG uptake occurring a few days after the initiation of treatment to predict the response to hormone therapy [6]. Apart from non-invasive tumor size measurements, the precise time course of tumor biological response to these therapeutic techniques is not well known. For example, to study the effects of chemotherapy, aromatase inhibitors or combined therapy on tumor cell viability and ER expression, the use of invasive techniques such as biopsy in humans or dissection studies in animals is needed. By allowing the follow-up of the same animal for the whole course of the therapy, SA-PET reduces the number of animal required for such studies and provides more reliable experimental data while giving a more realistic view of the therapeutic course.

The MCF-7 xenograft in nude mice has been widely used in the past, however this model presents some shortcomings. Contrary to human tumors that triggers an immune response from the host which contributes to an increased FDG uptake, MCF-7 cells grow relatively unchallenged in its immune-deficient host. These tumors are also slow growing and require the implantation of estrogen pellets which makes the whole inoculation process more cumbersome. Estrogen can also occupy ER and block access to the receptor for radiolabeled estrogen imaging studies. Although the blood concentration of estradiol falls rapidly after removal of the estrogen pellets, the intracellular receptors could be occupied for a longer period after a prolonged *in vivo* exposure to estradiol. This is supported by the faster blood clearance and slightly different biodistribution of FES observed in the animals who received the estrogen pellets.

We obtained our MCF-7 cells from the American Type Culture Collection (ATCC), and achieved growth rates similar to what was observed by other authors with unmodified MCF-7 cells[33]. Although MCF-7 cells from other sources might have more favorable growth properties[22, 34], this cell line remains the most commonly used model to evaluate new hormone therapy drugs. The behavior of MCF-7 cells varies across laboratories [34] and the tendency of this model, in our hands, to have lower ER receptor concentration *in vivo* made it less reliable for use in small animal PET imaging. These problems have prompted the development of genetically modified MCF-7 cells, which exhibit faster rates of growth and which are more responsive to hormonal therapy [35]. On the other hand the murine MC7-L1 and MC4-L2 tumors are a good alternative to xenografts for estrogen receptor imaging as they can be grown in normal Balb/c mice in the absence of estrogen priming. Their rate of growth is rapid and they respond to

some of the drugs currently used for ER⁺ breast cancer therapy. We also found a good correlation between their rate of growth and FDG uptake. The comparative uptake of FES in these murine tumors was consistent with their relative ER concentration as measured *in vitro*. Both MC7-L1 and MC4-L2 tumors responded well to chemotherapy with either Doxorubicin or Methotrexate and to the aromatase inhibitors Letrozole and Exemestane. With Tamoxifen, we noticed that doubling the dose from 8 mg/kg/day to 16 mg/kg/day resulted in a loss of tumor growth inhibition, possibly from growth stimulation by this partial agonist. Similarly, the steroidal aromatase inhibitor Exemestane was effective in controlling tumor growth in MC7-L1 tumors at 5 mg/kg/day but not at 25 mg/kg/day. Both compounds are steroidal partial agonists. Tamoxifen is known to stimulate some breast cancers[36] while exemestane is known, in humans, to produce androgenic side-effects [37]. The lack of response at high doses with these two drugs might be related to a weak but significant stimulating (possibly estrogenic) effect at high doses. Tamoxifen can transiently stimulate MCF-7 tumor growth, but eventually causes a reduction in tumor growth even at higher doses[21]. These differences in hormone therapy response, including those observed between the various murine cell lines, warrant further investigation and may provide interesting models to study hormone therapy resistance.

In conclusion, the Balb/c breast cancer cell lines MC7-L1 and MC4-L2 are good models for SA-PET monitoring of tumor growth and estrogen receptor content. They provide consistent ER expression *in vivo*, with faster growth than human breast cancer cells implanted in immune-deficient animals. Excellent quantitative images of tumor

metabolic activity (FDG) and ER expression (FES) could be obtained *in vivo* with SA-PET imaging using this model.

Acknowledgements.

This project was supported by the Canadian Breast Cancer Research Initiative (CBCRI) grant 012301, the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grant MOP-44065 and the Clinician-scientist scholarship program (CIHR).

References

- [1] Rose, C., Thorpe, S. M., Andersen, K. W., Pedersen, B. V., Mouridsen, H. T., Blichert-Toft, M., and Rasmussen, B. B. Beneficial effect of adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients with high oestrogen receptor values. *Lancet* 1985;1:16-9.
- [2] Bertelsen, C. A., Giuliano, A. E., Kern, D. H., Mann, B. D., Roe, D. J., and Morton, D. L. Breast cancers: estrogen and progesterone receptor status as a predictor of in vitro chemotherapeutic response. *Journal of Surgical Research* 1984;37:257-63.
- [3] Clark, G. M., Sledge, G. W., Jr., Osborne, C. K., and McGuire, W. L. Survival from first recurrence: relative importance of prognostic factors in 1,015 breast cancer patients. *Journal of Clinical Oncology* 1987;5:55-61.
- [4] Bombardieri, E. and Crippa, F. PET imaging in breast cancer. *Q J Nucl Med* 2001;45:245-56.
- [5] Wahl, R. L., Zasadny, K., Helvie, M., Hutchins, G. D., Weber, B., and Cody, R. Metabolic monitoring of breast cancer chemohormonotherapy using positron emission tomography: initial evaluation. *J Clin Oncol* 1993;11:2101-11.
- [6] Mortimer, J. E., Dehdashti, F., Siegel, B. A., Trinkaus, K., Katzenellenbogen, J. A., and Welch, M. J. Metabolic flare: indicator of hormone responsiveness in advanced breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2001;19:2797-803.
- [7] Stafford, S. E., Gralow, J. R., Schubert, E. K., Rinn, K. J., Dunnwald, L. K., Livingston, R. B., and Mankoff, D. A. Use of serial FDG PET to measure the response of bone-dominant breast cancer to therapy. *Acad Radiol* 2002;9:913-21.

- [8] Burcombe, R. J., Makris, A., Pittam, M., Lowe, J., Emmott, J., and Wong, W. L. Evaluation of good clinical response to neoadjuvant chemotherapy in primary breast cancer using [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Eur J Cancer* 2002;38:375-9.
- [9] Mankoff, D. A., Dunnwald, L. K., Gralow, J. R., Ellis, G. K., Charlop, A., Lawton, T. J., Schubert, E. K., Tseng, J., and Livingston, R. B. Blood flow and metabolism in locally advanced breast cancer: relationship to response to therapy. *Journal of Nuclear Medicine* 2002;43:500-9.
- [10] Van de Wiele, C., De Vos, F., Slegers, G., Van Belle, S., and Dierckx, R. A. Radiolabeled estradiol derivatives to predict response to hormonal treatment in breast cancer: a review. *Eur J Nucl Med* 2000;27:1421-33.
- [11] Robertson, J. F., Nicholson, R. I., Bundred, N. J., Anderson, E., Rayter, Z., Dowsett, M., Fox, J. N., Gee, J. M., Webster, A., Wakeling, A. E., Morris, C., and Dixon, M. Comparison of the short-term biological effects of 7 α -[9-(4,4,5,5,5-pentafluoropentylsulfinyl)-nonyl]estra-1,3,5, (10)-triene-3,17 β -diol (Faslodex) versus tamoxifen in postmenopausal women with primary breast cancer. *Cancer Research* 2001;61:6739-46.
- [12] Noguchi, M., Tajiri, K., Taniya, T., Kumaki, T., Ashikari, A., and Miyazaki, I. Influence Of Hormones On Proliferation Of Er-Positive Cells and Er-Negative Cells Of Human Breast Cancer (Mcf-7). *Oncology* 1990;47:19-24.
- [13] Yang, K. P. and Samaan, N. A. Reduction of estrogen receptor concentration in Mcf-7 human breast carcinoma cells following exposure to chemotherapeutic drugs. *Cancer Res* 1983;43:3534-8.

- [14] Lecomte, R., Cadorette, J., Rodrigue, S., Lapointe, D., Rouleau, D., Bentourkia, M., Yao, R., Msaki, P., and Schmutz, G. Initial results from the Sherbrooke avalanche photodiode positron tomograph. *IEEE Trans Nucl Sci* 1996;43:1952-7.
- [15] Marriott, C. J., Cadorette, J. E., Lecomte, R., Scasnar, V., Rousseau, J., and van Lier, J. E. High-resolution PET imaging and quantitation of pharmaceutical biodistributions in a small animal using avalanche photodiode detectors [see comments]. *J Nucl Med* 1994;35:1390-6.
- [16] Lapointe, D., Brasseur, N., Cadorette, J., La Madeleine, C., Rodrigue, S., van Lier, J. E., and Lecomte, R. High-resolution PET imaging for in vivo monitoring of tumor response after photodynamic therapy in mice. *Journal of Nuclear Medicine* 1999;40:876-82.
- [17] Croteau, E., Bénard, F., Gauthier, M., Cadorette, J., Aliaga, A., Bentourkia, M., and Lecomte, R. Quantitative gated PET for the assessment of left ventricular function in small animals. *J Nucl Med* 2003;44:1655-61.
- [18] Hamacher, K., Coenen, H. H., and Stocklin, G. Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[18F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution. *Journal of Nuclear Medicine* 1986;27:235-8.
- [19] Lim, J. L., Zheng, L., Berridge, M. S., and Tewson, T. J. The use of 3-methoxymethyl-16 beta, 17 beta-epiestriol-O-cyclic sulfone as the precursor in the synthesis of F-18 16 alpha-fluoroestradiol. *Nucl Med Biol* 1996;23:911-5.
- [20] Schafer, J. M., Lee, E. S., O'Regan, R. M., Yao, K., and Jordan, V. C. Rapid development of tamoxifen-stimulated mutant p53 breast tumors (T47D) in athymic mice. *Clinical Cancer Research* 2000;6:4373-80.

- [21] Osborne, C. K., Hobbs, K., and Clark, G. M. Effect of estrogens and antiestrogens on growth of human breast cancer cells in athymic nude mice. *Cancer Research* 1985;45:584-90.
- [22] Jordan, V. C., Gottardis, M. M., Robinson, S. P., and Friedl, A. Immune-deficient animals to study "hormone-dependent" breast and endometrial cancer. *Journal of Steroid Biochemistry* 1989;34:169-76.
- [23] Lanari, C., Luthy, I., Lamb, C. A., Fabris, V., Pagano, E., Helguero, L. A., Sanjuan, N., Merani, S., and Molinolo, A. A. Five novel hormone-responsive cell lines derived from murine mammary ductal carcinomas: in vivo and in vitro effects of estrogens and progestins. *Cancer Research* 2001;61:293-302.
- [24] Olea-Serrano, N., Devleeschouwer, N., Leclercq, G., and Heuson, J. C. Assay for estrogen and progesterone receptors of breast cancer cell lines in monolayer culture. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1985;21:965-73.
- [25] Tomayko, M. M. and Reynolds, C. P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology* 1989;24:148-54.
- [26] Lecomte, R., Cadorette, J., Richard, P., Rodrigue, S., and Rouleau, D. Design and engineering aspects of a high resolution positron tomograph for small animal imaging. *IEEE Trans Nucl Sci* 1994;41:1446-52.
- [27] Selivanoc, V., Picard, Y., Cadorette, J., Rodrigue, S., and Lecomte, R. Detector response models for statistical iterative image reconstruction in high resolution PET. *IEEE Trans Nucl Sci* 2000;47:1168-75.
- [28] Ju, Y. H., Doerge, D. R., Allred, K. F., Allred, C. D., and Helferich, W. G. Dietary genistein negates the inhibitory effect of tamoxifen on growth of

- estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) cells implanted in athymic mice. *Cancer Research* 2002;62:2474-7.
- [29] Pomper, M. G., VanBrocklin, H., Thieme, A. M., Thomas, R. D., Kiesewetter, D. O., Carlson, K. E., Mathias, C. J., Welch, M. J., and Katzenellenbogen, J. A. 11 beta-methoxy-, 11 beta-ethyl- and 17 alpha-ethynyl-substituted 16 alpha-fluoroestradiols: receptor-based imaging agents with enhanced uptake efficiency and selectivity. *Journal of Medicinal Chemistry* 1990;33:3143-55.
- [30] Seimbille, Y., Rousseau, J., Benard, F., Morin, C., Ali, H., Avvakumov, G., Hammond, G. L., and van Lier, J. E. 18F-labeled difluoroestradiols: preparation and preclinical evaluation as estrogen receptor-binding radiopharmaceuticals. *Steroids* 2002;67:765-75.
- [31] Kiesewetter, D., Kilbourn, M., Landvatter, S., Heiman, D., Katzenellenbogen, J., and Welch, M. Preparation of four fluorine-18-labeled estrogens and their selective uptake in target tissues of immature rats. *J Nucl Med* 1984;25:1212-21.
- [32] Howell, A., Howell, S. J., Clarke, R., and Anderson, E. Where do selective estrogen receptor modulators (SERMs) and aromatase inhibitors (AIs) now fit into breast cancer treatment algorithms? *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2001;79:227-37.
- [33] Guo, P., Fang, Q., Tao, H. Q., Schafer, C. A., Fenton, B. M., Ding, I., Hu, B., and Cheng, S. Y. Overexpression of vascular endothelial growth factor by MCF-7 breast cancer cells promotes estrogen-independent tumor growth in vivo. *Cancer Research* 2003;63:4684-91.

- [34] Osborne, C. K., Hobbs, K., and Trent, J. M. Biological Differences Among Mcf-7 Human Breast Cancer Cell Lines From Different Laboratories. *Breast Cancer Res Treat* 1987;9:111-21.
- [35] Brodie, A., Jelovac, D., and Long, B. J. Predictions from a preclinical model: studies of aromatase inhibitors and antiestrogens. *Clin Cancer Res* 2003;9:455S-9S.
- [36] Osborne, C. K. Mechanisms for tamoxifen resistance in breast cancer: possible role of tamoxifen metabolism. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 1993;47:83-9.
- [37] Buzdar, A. U., Robertson, J. F., Eiermann, W., and Nabholz, J. M. An overview of the pharmacology and pharmacokinetics of the newer generation aromatase inhibitors anastrozole, letrozole, and exemestane. *Cancer* 2002;95:2006-16.

Table 1. %ID/g values from SA-PET at one hour post injection.

	%ID/g (sem) ^a	
	<i>FDG (NU/NU)</i>	<i>FES (NU/NU)</i>
MCF-7	1.39 (0.26)	0.26 (0.08)
T-47D ^b	n/a	0.25 (n/a)
MDA-MB-231 ^c	2.07 (0.16)	0.24 (0.03)
Ref. Tissue	0.56 (0.02)	0.32 (0.06)
	<i>FDG (Balb/c)</i>	<i>FES (Balb/c)</i>
MC7-L1	4.97 (0.37)	2.17 (0.28)
MC4-L2	4.59 (0.33)	3.20 (0.25)
MC4-L3 ^b	n/a	2.60 (n/a)
Ref. Tissue	1.65 (0.21)	0.57 (0.08)

^a Average %ID/g values (n = 6-7) calculated from SA-PET images following intravenous administration of FES and FDG in tumor bearing mice and standard error of the mean sem.

^b n = 1

^c Control tumor devoid of receptors.

n/a = no data available

Table 2. Tumor-to-tissue ratios from SA-PET

	Ratio \pm sem ^a	
	<i>FDG (NU/NU)</i>	<i>FES (NU/NU)</i>
MCF-7	2.49 \pm 0.52	0.87 \pm 0.18
T-47D	n/a	0.33 ^b -----
MDA-MB-231 ^c	3.67 \pm 0.26	0.79 \pm 0.14
	<i>FDG (Balb/c)</i>	<i>FES (Balb/c)</i>
MC7-L1	3.14 \pm 0.28	4.44 \pm 0.71
MC4-L2	2.92 \pm 0.31	6.73 \pm 0.99
MC4-L3	n/a	3.25 ^b -----

^a Average tumor tissue ratio and standard error of the mean (n = 6-7)

^b n = 1

^c Control tumor devoid of receptors.

n/a = no data available

Table 3. Tissue distribution of radioactivity at 2.5 hours post-injection of FES in tumor bearing mice.

Tissues	% ID/g (sem) ^a			
	<i>NU/NU mice</i>		<i>Balb/c</i>	
	FES	+E2	FES	+E2
Brain	0.17 ± 0.04	0.08 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.09 ± 0.01
Heart	0.27 ± 0.06	0.19 ± 0.05	0.34 ± 0.03	0.27 ± 0.04
Muscle	0.45 ± 0.06	0.25 ± 0.11	0.59 ± 0.04	0.31 ± 0.05
Bone	0.55 ± 0.12	0.20 ± 0.04	0.64 ± 0.05	0.42 ± 0.09
Plasma	0.28 ± 0.05	0.47 ± 0.01	0.60 ± 0.06	0.61 ± 0.08
Lungs	0.54 ± 0.15	0.50 ± 0.17	0.49 ± 0.04	0.44 ± 0.05
Spleen	0.54 ± 0.18	0.25 ± 0.09	0.45 ± 0.03	0.26 ± 0.04
Blood	0.23 ± 0.04	0.31 ± 0.07	0.45 ± 0.04	0.45 ± 0.05
Liver	3.68 ± 0.83	3.59 ± 0.49	4.57 ± 0.38	4.38 ± 0.60
Fat	0.96 ± 0.36	0.27 ± 0.01	4.11 ± 0.66	1.05 ± 0.17
Ovaries	5.30 ± 0.66	n/a	2.39 ± 0.13	0.75 ± 0.13
Kidneys	1.23 ± 0.29	0.99 ± 0.11	1.65 ± 0.19	1.26 ± 0.21
Uterus	2.16 ± 0.33	0.42 ± 0.26	6.73 ± 0.57	0.53 ± 0.05
MCF-7	0.75 ± 0.12	n/a	---	---
T-47D ^b	0.80 -----	---	---	---
T-231	0.34 ± 0.02	0.37 ± 0.02	---	---
MC7-L1	---	---	1.81 ± 0.22	0.42 ± 0.06
MC4-L2	---	---	2.13 ± 0.24	0.47 ± 0.09
MC4-L3	---	---	1.43 ± 0.51	0.40 ^b -----

^a Mean percent of the injected dose per gram of tissues (% ID/g) and standard error of the mean (sem) for female *NU/NU* mice (n = 7) and *Balb/c* mice (n = 21) after iv injection of (20 to 300 µCi, 100 to 400 µL) of FES, with or without coinjection of 20 µg of nonradioactive estradiol (+E2).

^b n = 1

n/a = No data available.

Table 4. Tumor to tissue ratio from distribution data

	Ratio \pm sem ^a					
	Tumor/Blood		Tumor/Uterus		Tumor/NT	
	FES	FES +E ₂	FES	FES +E ₂	FES	FES +E ₂
MC7-L1	4.32	0.97	0.28	0.80	1.50	0.78
	\pm 0.68	\pm 0.12	\pm 03	\pm 0.06	\pm 0.32	\pm 0.11
MC4-L2	4.79	1.12	0.35	0.84	1.95	0.84
	\pm 0.43	\pm 0.26	\pm 0.04	\pm 0.15	\pm 0.29	\pm 0.16
MC4-L3 ^b	4.55	0.68	0.54	0.59	0.58	0.63
	\pm ---	\pm ---	\pm ---	\pm ---	\pm ---	\pm ---
MCF-7	4.70	n/a	0.34	n/a	1.31	n/a
	\pm 0.88		\pm 0.09		\pm 0.20	
T-47D ^b	5.33	n/a	0.11	n/a	1.21	n/a
	\pm ---		\pm ---		\pm ---	
MDA-MB-231 ^c	2.40	1.22	0.36	0.89	0.99	1.56
	\pm 0.74	\pm 0.24	\pm 0.19	\pm 0.08	\pm 0.44	\pm 0.26

^a Average percent injected dose per gram of tissue (%ID/g) and standard error of the mean (n = 16)

^b n = 1

^c Control tumor devoid of receptors.

n/a = no data available

Figure legends.

Figure 1. Mean tumor volume (mm^3) and standard error of the mean (sem) for human xenografts (MCF-7 n = 8; T-47D n = 3; MDA-MB-231 n = 8) and murine tumors (MC7-L1 n = 10; MC4-L2 n = 10; MC4-L3 n = 6) inoculated respectively in athymic (NU/NU) and Balb/c mice.

Figure 2. PET images of mice bearing different tumors (L1 = MC7-L1; L2 = MC4-L2; H = heart; L = liver), registered 1-h post-injection of FDG (A) and FES (B).

Figure 3. Correlation between the %ID/g values obtained from PET imaging uptake values and from biodistribution. PET imaging was done one-hour post injection and the animals were dissected 1.5 hours later. r = Pearson correlation coefficient.

Figure 4. Blood estradiol concentration in pico-moles per liter, following removal the estradiol pellet in nude mice (A) and in a group of nude mice which was not implanted with the pellet (B).

Figure 5. Immunocytochemical visualization of estrogen (Top) and progesterone (Bottom) receptor in a MCF7-L1 tumor (left) and a control tumor (right) devoid of ER excised from a nude mouse.

Figure 6. Effect of therapy on MC7-L1 (A) and MC4-L2 (B) tumor growth, all drugs were administrated orally except for Methotrexate and Doxorubicin, which were

Small animal PET imaging of estrogen receptors

administrated intravenously. (a) Control, (b) Vehicle only, (c) Exemestane 5 mg/kg/day, (d) Exemestane 25 mg/kg/day, (e) Letrozole 5 mg/kg/day, (f) Tamoxifen 16 mg/kg/day, (g) Tamoxifen 8 mg/kg/day, (h) Raloxifene 16 mg/kg/day, (i) Raloxifene 8 mg/kg/day, (j) Methotrexate 12 mg/kg/week [i.v.], (k) Doxorubicin 10 mg/kg/week [i.v.].

Figure 1

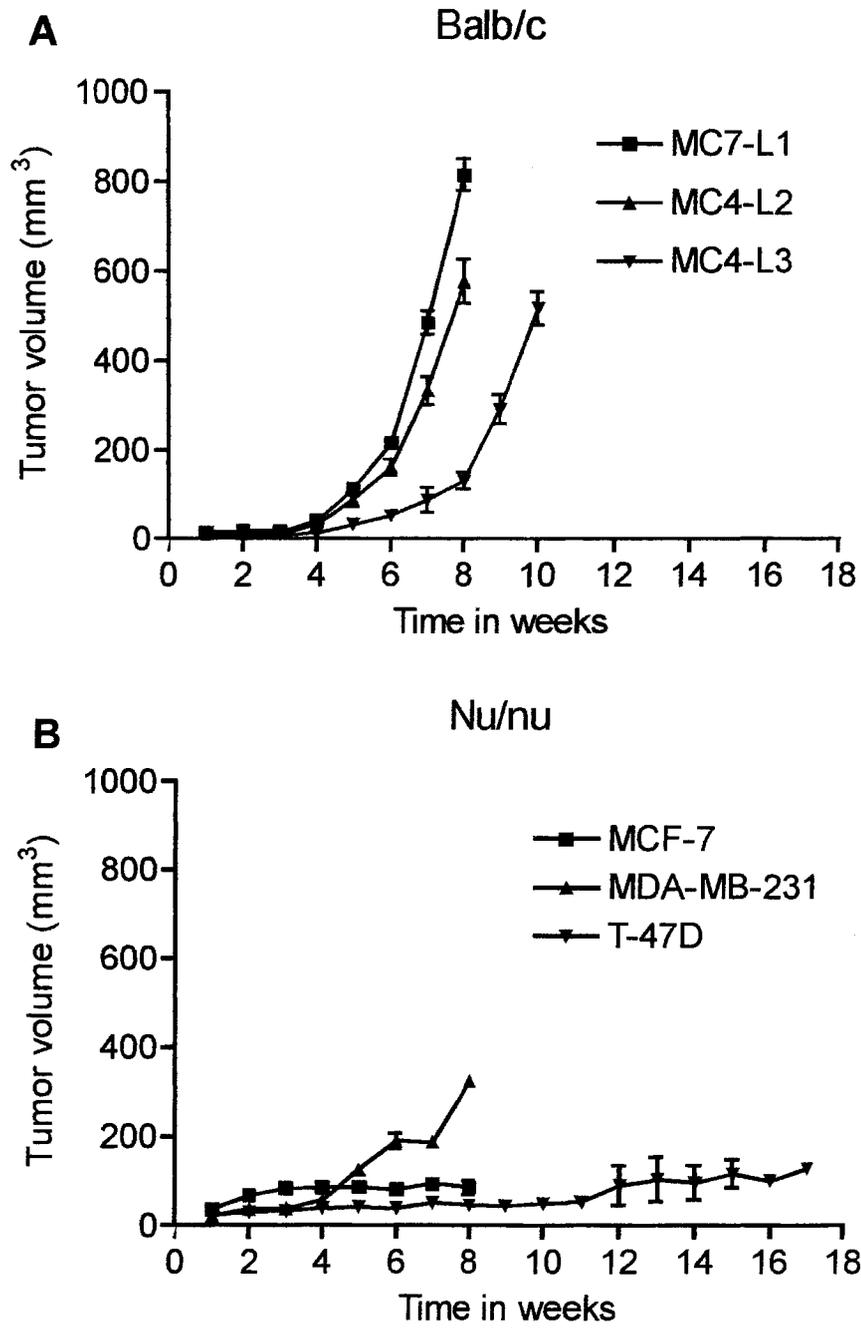


Figure 2

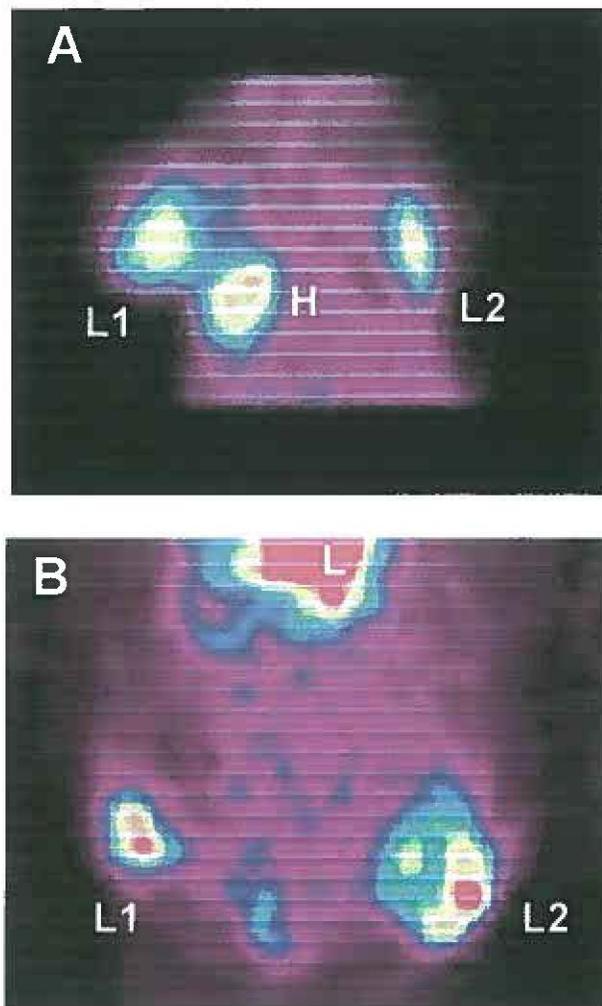


Figure 3

Correlation between PET and dissection data

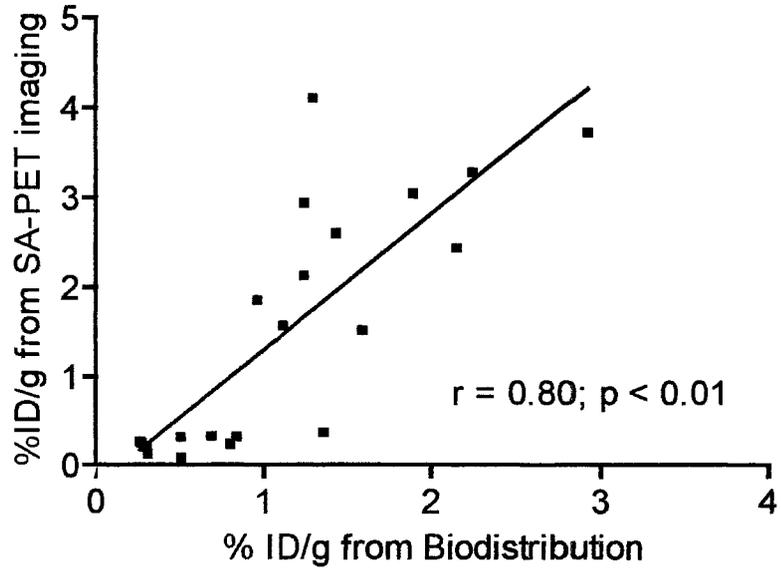


Figure 4

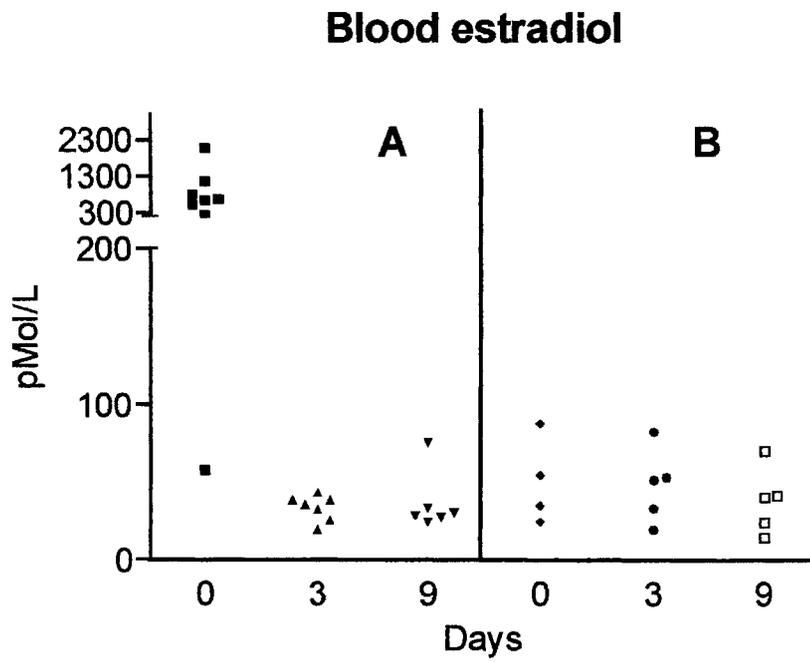


Figure 5

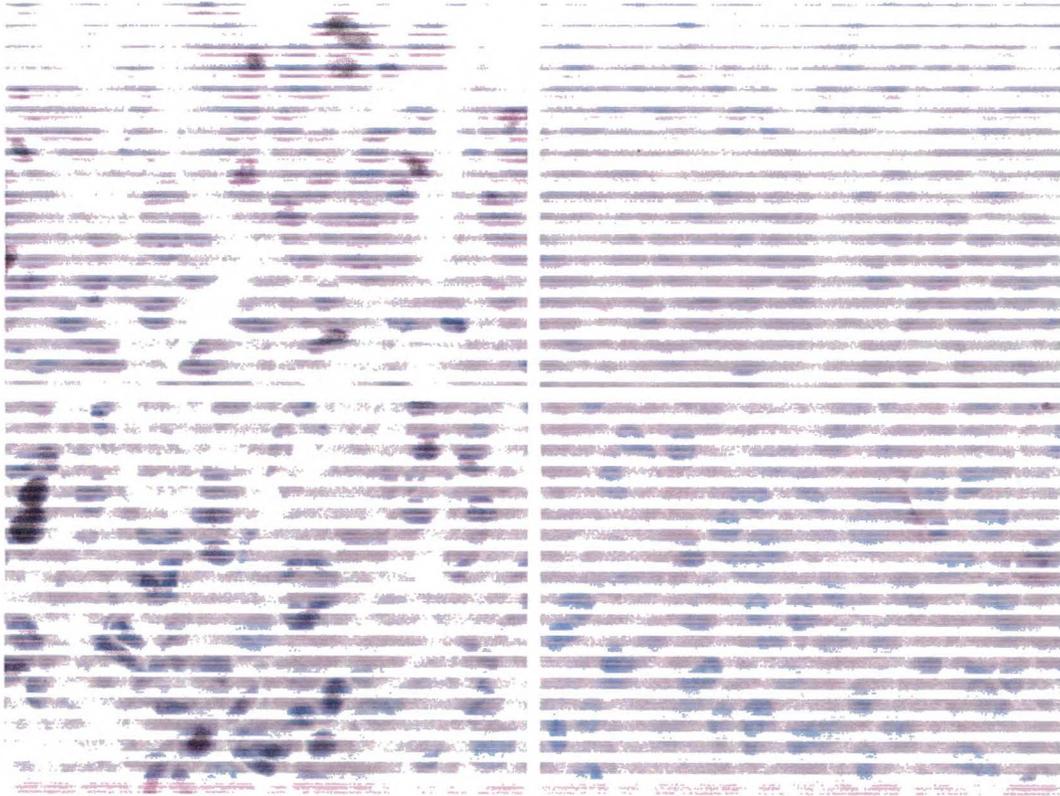
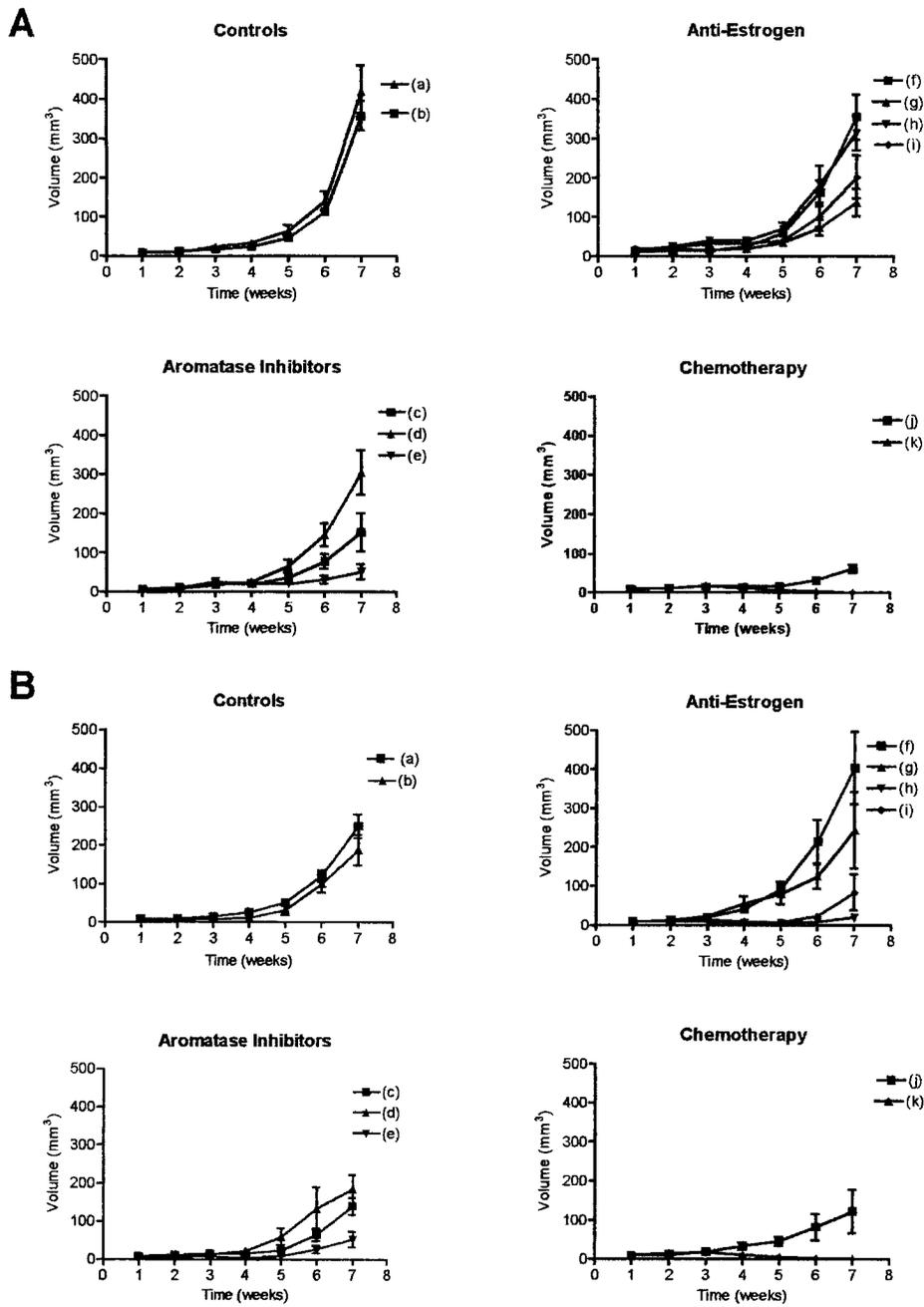


Figure 6



III. ARTICLE II

A small animal PET study of the effect of glycemia and therapy upon the uptake of FDG in breast cancer models.

Antonio Aliaga, Jacques A. Rousseau, Jules Cadorette, Étienne Croteau, Johan E. van Lier, Roger Lecomte et Francois Bénard.

Soumis à Nuclear Medicine and Biology (Septembre 2004)

Cette étude fait suite à notre projet de développement d'un modèle animal chez la souris avec RE. Grâce à l'imagerie TEP à haute résolution, nous avons mesuré la réponse tumorale sous différentes interventions thérapeutiques. Nous avons ensuite comparé ces données avec la mesure du volume tumoral. Au cours de cette étude nous avons évalué différents paramètres, principalement la glycémie, pouvant influencer la captation du FDG. Les résultats nous ont permis de conclure que la TEP permettait d'obtenir des informations uniques sur le métabolisme tumoral qui viennent ajouter des éléments importants pour la compréhension des mécanisme impliqués dans la réponse cellulaire aux différents modes de traitement.

**A small animal PET study of the effect of glycemia and therapy upon the uptake of
FDG in a breast cancer models**

Antonio Aliaga, Jacques A. Rousseau, Jules Cadorette, Étienne Croteau, Johan E. van
Lier, Roger Lecomte and Francois Bénard*

***Metabolic and Functional Imaging Center, Department of Nuclear Medicine
& Radiobiology, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke,
Québec, Canada***

Abbreviated Title: Small animal PET imaging of tumor metabolism.

Key words: Positron emission tomography; PET; small animal PET; estrogen receptor;
breast cancer; radiopharmaceutical, tumor metabolism.

* Corresponding author:

François Bénard, MD
Department of Nuclear Medicine & Radiobiology
Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke
3001, 12th Ave N.
Sherbrooke, QC, Canada J1H 5N4
Phone: (819) 346-1110 ext. 11865
FAX: (819) 820-6490
E-mail: francois.benard@USherbrooke.ca

Abstract

Animal tumor models have proved to be an invaluable tool for the development of new approaches to breast cancer therapy. In most animal studies, however, the tumor volume is the sole parameters used to judge the efficacy of new drugs. Therefore in this study, we have assessed the feasibility of using small animal PET imaging for monitoring tumor metabolic response to therapy. **Method:** MC4-L2 and MC7-L1 ER+ murine mammary carcinoma were inoculated in Balb/c mice. Small animal PET imaging using fluorine-18-labeled 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (^{18}FDG) was used to assess tumor metabolic activity. The effect of blood glucose level (2.7-12.6 mmol/L) on tumor ^{18}FDG uptake was established prior to treatment initiation. Imaging was done before and at days 1, 7 and 14 following administration of Doxorubicin 10 mg/kg iv on day 0 (n=9) or 5 mg/kg at day 0 and day 7 (n=6), Methotrexate 12 mg/kg iv on day 0 (n=6); Letrozole 5 mg/kg/day oral (n=6); control (n=9). The percent injected dose for the tumor uptake of ^{18}FDG was calculated from the $\text{SUV}_{4\text{pix}}$, the maximum 4-pixel uptake value within an ROI drawn around the tumor. Tumor volume was measured with a caliper at the same time interval and the results were compared with those of PET imaging. **Results:** Tumor ^{18}FDG uptake was inversely related to blood glucose level, stressing the importance of standardizing glycemia by fasting the animals before imaging. All treatments resulted in a decrease in tumor growth rate and end volume, ^{18}FDG uptake was also markedly decreased following treatment although a flare reaction was observed at day 7 the intensity of which varied according to the treatment modality. Therefore in evaluating therapeutic regimens, small animal PET imaging contributes complementary metabolic

information to volume measurements that can be used to assess the time course of the tumor response to therapy and adjust the treatment accordingly.

1. Introduction

Although the treatment of breast cancer has improved over the years, the mortality remains high. The American Cancer Society estimates that 203,500 new cases are occurring each year in the United States and that more than 39,400 women will die from this disease in 2002. This can be in part attributed to the development of cancer cells resistant to chemotherapeutic agents (Volk 2000, Dowsett 2001, Clarke 2001) and to changes in the responsiveness of ER+ tumors to hormonal therapy. To address this problem new drugs and combination therapy strategies need to be set forth. As a result, suitable animal tumor models and tumor response measurement techniques can be helpful to develop these new therapies and assess their efficacy.

Tumor response to therapy is often estimated from tumor volume measurements, but these techniques fail to convey metabolic effect at the cellular level. In patients, PET imaging of breast tumors with ^{18}F FDG (Bombardieri 2001) is routinely used for the measurement of the metabolic response of tumor cells to therapy. The resolution of clinical PET camera however is not sufficient for accurate imaging of tumors in small laboratory animals such as rats and mice. This has promoted the development of high resolution PET scanners dedicated to small animal imaging.

Previous experiment has demonstrated that the murine MC7-L1 and MC4-L2 cell lines are a suitable model for ER positive breast tumors (Aliaga 2004).

The aim of the present paper is to assess the feasibility of using Small Animal PET imaging for monitoring the response of estrogen receptor positive (ER+) murine breast cancer tumors to hormone and chemotherapy. (Lecomte 1996 Mariott 1994, Lapointe 1999, Croteau 2002).

2. Materials and Methods

2.1 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 (Ebcoc, Vancouver, BC, Canada). For the synthesis of FDG we used established procedures (Hamacher 1986).

2.2 Tumor models

Metastatic murine ER+ mammary ductal carcinomas MC4-L2 and MC7-L1 tumor models were generously provided by Dr Molinolo from the Instituto de Biología y Medicina Experimental, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas en Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina (Lanari 2001). The cells were grown in T75 flasks in DMEM/F-12 with 15 mM HEPES buffer, L-glutamine, penicillin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10% FBS (Gibco BRL, Life Technologies) and 10 nM Medroxy Progesterone Acetate (MPA) (Sigma Chemical, Ontario, Canada).

2.3 Animal

The animal experiments were conducted in accordance with the recommendations of the Canadian Council on Animal Care and of the in-house Ethics Committee for Animal Experiments. Murine mammary tumor cells lines MC4-L2 and MC7-L1 were inoculated subcutaneously (1×10^7 cells) on the thigh of Balb/c mice (15-20 grams). All invasive procedures were done while the animals were under anesthesia (1 ml/kg i.m. of a solution containing 13 mg of Ketamine and 86 mg of Xylazine per ml). Tumor size was measured on a weekly basis and computed using the ellipsoid formula as follow: $V_{\text{mm}^3} = \text{width} \times \text{length} \times \text{thickness} \times 0.524$ (Tamayko 1989).

2.4 Glycemia

The effect of fasting on blood glucose level was evaluated in a group of 10 mice deprived of food for a period of 24 hours. The possible consequence of coprophagia or of the presence of tumor on glycemia was investigated in a separate group of 15 mice (Table 1). Glycemia (mmol/L) was measured with a commercial glucometer from a drop of blood obtained by puncturing the animal heel.

2.5 PET Imaging

Mice were imaged 6 weeks following tumor inoculation at which time tumor size had reached more than 100 μl . Imaging was performed immediately (day 0) and at days 1, 7 and 14 following the initiation of treatments. All animals were fasted for 15 hours and had their glycemia measured before ^{18}F FDG injection and imaging.

Images were acquired using the Sherbrooke avalanche photodiode Small Animal PET scanner (Marriott 1994, Lecomte 1994), which is able to achieve a 14 μ l volumetric resolution (2.1 mm FWHM transaxial) (Lecomte 1996). Prior to imaging, the camera was calibrated with a phantom filled with water containing 18.5 MBq (500 μ Ci) of FDG in a volume appropriate for a mouse (15 ml). Imaging was performed while the animal was under Isoflurane anesthesia (1% at 2 l/min oxygen flow). During imaging, the animal was placed supine on the bed of the camera. Imaging was initiated 1-h after the i.v. administration of 18.5-22 MBq (500-600 μ Ci) of FDG in 200-400 μ l of normal saline. Three bed positions were acquired with radial “clam shell” (Lecomte 1994) and axial double sampling mode. The images were reconstructed using 25 iterations of the maximum likelihood expectation maximization (ML-EM) (Selivanov 2000) algorithm. Overall, 54 images (18 per bed position) in 128 x 128 pixels format (voxel size of 0.475 mm x 0.475 mm x 0.458 mm) were obtained covering 24.75 mm axially.

2.6 Quantitative image analysis

The 4-pixels standardized uptake values (SUV_{4pix}) were obtained from the Sherbrooke LabTEP developed in-house software using 3D regions of interest (ROI) drawn around areas of increased tracer accumulation. All values were corrected for partial volume effect. The results were expressed as the percent of the injected dose per gram of tissue; $\%ID/g = (SUV_{4pix} / \text{mice body weight}) \times 100$ and percent change = $((\text{Volume}_{day 0} - \text{Volume}_{day n}) / \text{Volume}_{day n}) \times 100$.

2.7 Therapeutic regimen

Doxorubicin (Faulding Canada, Montréal, Québec, Canada), Methotrexate (Faulding Canada, Montreal, Quebec, Canada) and Letrozole (Novartis Pharma Canada, Mississauga, Ontario, Canada) were given according to Table 2. The control groups received no medication.

2.8 Statistics

The data variability was estimated by the standard error of the mean (sem). The tumor radioactivity uptake of the different groups was compared by analysis of variance. A probability value of 0.05 was considered statistically significant. The data from the MC4-L2 and MC7-L1 were processed independently.

3. Results

The effect of blood glucose level on the uptake of ^{18}F FDG by tumor cells was investigated in mice ($n=30$) with tumors ranging in size from 100 to 800 mm^3 and for glucose levels from 2.7 to 12.6 mmol/L . For both tumor models, we observed a significant decrease (MC7-L1 slope = -0.63; MC4-L2 slope -0.38; $p<0.02$) in tumor uptake of ^{18}F FDG with increasing glycemia (Figure 1)^{1,2}. Considering these results our first concern was to standardize the blood glucose values before measuring the outcome of treatment on tumor FDG uptake. To this effect, blood glucose level was monitored in a group of 10 tumor free mice fasted for a period of 24 hours. It can be seen from (Figure 2) that blood glucose level fell rapidly following food removal and then levels off as evidenced by the average

¹ High blood glucose also decreased the uptake of FDG by reference tissue, but to a lesser extent than for the tumor (slope -0.008; $p=.03$); see Appendix figure 3. If the tumor to reference tissue ratio is used instead of the %ID/g values, the negative relationship with glycemia remains, but it is no more statistically significant.

² The dispersion of the data around their mean was not improved significantly when tumor to reference tissue ratio values were used instead of %ID/g ($\text{CV} \approx 22\%$).

glycemia values at 12 and 24 hours, which were not statistically different ($p>0.05$). Another concern about glycemia was the possibility of coprophagia during fasting. This was addressed in 2 groups of 5 mice fasted for 17 hours while housed either in a wooden chip lined cage or in a mesh wired floored cage designed to prevent coprophagia. The glycemia of the two groups were found to be statistically equivalent (Independent Student-t test $p>0.05$) (Figure 3, Panel A). Similarly the absence or presence of tumors did not influenced glycemia (Figure 3, Panel B).

The effect of therapeutic regimens on the tumor volume and metabolic activity as measured by small animal PET ^{18}F FDG uptake was compared in mice bearing both MC7-L1 and MC4-L2 tumors. All animals were fasted 15 hours prior to ^{18}F FDG PET resulting in more consistent blood glucose values (4.94 mmol/L, sem 0.18). The tumor ^{18}F FDG uptake was calculated from $\text{SUV}_{4\text{pix}}$ values, corrected for partial volume effect, and expressed as the %ID/g of tumors (Table 3). In non-treated animals, the tumor ^{18}F FDG uptake was found to be independent of size³ for tumors ranging in volume from 100 to 800 mm³.

The results of the treatment on tumor volume and ^{18}F FDG uptake are presented in (Table 3). At day zero before treatment initiation, the tumor volumes for both tumor models were equivalent. After the first week however, we observe a slowdown in tumor growth for the treated groups, this effect being most evident in the mice receiving Doxorubicin either as a single (10 mg/kg) or the distributed dose (2 x 5mg/kg). The trend observed after the first week of treatments maintained itself and by day 14, the volume of

³ For larger tumors, we observed an increase in %ID/g values with increasing tumor size; however these tumors were partly necrotic and not retained for this study.

all treated tumors was significantly smaller (2 Way ANOVA, $p < 0.05$) as compared to the control group (Figure 4). The chemotherapeutic Methotrexate and hormonal Letrozole drugs were less effective at controlling tumor growth. The tumor response to Letrozole was less effective for the MC4-L2 cell line as compared to the MC7-L1. This can be explained by the presence of a large percentage (30%) of ER- cells in the former tumor model.

At day 1 following treatment, we observed an overall decrease in cellular metabolic activity as measured by ^{18}F FDG PET imaging (Figure 5). For the MC4-L1 tumor the average metabolic activity of the treated tumors remained below that of the control group with the exception of Doxorubicin with distributed dose (2 x 5mg/kg) which peaked at day 7. The same pattern was observed for the MC7-L2 tumor model, although the difference between the control and treated tumors was less marked. Metabolic measurements however showed more variability as compared to volume measurements and the difference between the control and the treated tumors was only statistically significant ($p < 0.05$) for the Doxorubicin single dose regimen.

4. Discussion

We have previously shown (Aliaga 2004) that the murine MC7-L1 and MC4-L2 ER+ mammary tumor models presented several advantages over xenografts for the study of hormonal therapy by small animal PET scanning. Here, we have extended this study by considering more in depth the parameters involved in the ^{18}F FDG assessment of tumor

metabolic response to therapy and by comparing the metabolic response to that of tumor volume measurements.

The ^{18}F FDG-tumor uptake were reported in terms of %ID/g instead of SUV values as these are more often used in animal experiments and allow for direct comparisons with biodistribution studies. Nonetheless, these values were based on $\text{SUV}_{4\text{pix}}$ data and as such are amenable to confounding variables described by Keyes (Keyes 1995), including the body characteristics, the lesion size, the resolution of the scanner, the pharmacokinetics of the tracer and the glycemia. Although body characteristics and tumor size are difficult to control in a clinical setting, they can more easily be standardized in animal experiments. Animals of the same strain, sex, age and weight are available and tumor size range can be selected to minimize partial volume effect and optimize tumor size to scanner resolution ratio. Although in this study ^{18}F FDG uptake values were corrected for partial volume effect, following therapy some tumors presented a volume inferior to the linear portion of the recovery curve of the PET scanner. Similarly, by standardizing the scanning time and the time interval between injection and scanning, we avoided variations linked to the kinetics of tumor ^{18}F FDG uptake. The $\text{SUV}_{4\text{pix}}$ was preferred over the SUV_{mean} and the SUV_{max} because it is robust against user variation in defining ROI and random pixel activity variation respectively.

The blood glucose level was an important factor influencing the tumor ^{18}F FDG uptake. There was a significant negative correlation between the blood glucose and ^{18}F FDG uptake in tumors, as well as in the reference tissue. Depriving the animals of food for 15

hours helped lower blood glucose value, although much variation remained⁴. This variability in blood glucose values was not related to coprophagia or to the presence of the tumors. Therefore, it must reflect differences in animal activity pattern before imaging or stress induced by the imaging procedure itself. Using the tumor to reference tissue ratio⁵ to normalize the data for these differences in glycemia did not significantly decrease the data dispersion.

Tumor volume measurements give a global view of tumor response to therapy and are not affected by regions of hypoxia or necrosis. PET on the other hand when computed from the SUV_{4pix} allows us to target specifically the metabolic activity of the most viable cells, those often responsible for tumor regrowth and metastasis. Caution must however be exerted in interpreting the results of ^{18}F FDG uptake as the presence of other metabolically active cells especially those triggered by the immune response will also contribute to the overall tumor activity (Sapenpen 2003, Yoshioka 1997). Nonetheless the tumor uptake of ^{18}F FDG by the treated tumors was as expected decrease following treatment as compared to the control group and the overall the tumor uptake of ^{18}F FDG at day 1 was a fair indicator of the tumor growth rate and final volume. The sensitivity of ^{18}F FDG for the evaluation of acute tumor response to treatment is put in evidence when Doxorubicin is given as a single dose as compared to when the dose is spitted over day 1 and 7. In the former case we observe a much more important decrease in the tumor uptake of ^{18}F FDG as compared to the reduced dose. Although, on the long run the spitted dose was more effective in reducing tumor growth as compared to a single massive dose

⁴ Before fasting, mean glycemia was 11.39 mmol/L, sem 0.50 %, CV 24; after 17 hours fasting, glycemia dropped to 5.10 mmol/L, sem 0.16 %, CV 27.

of Doxorubicin. This leads us to conclude that ^{18}F FDG PET scans provide additional insight for the monitoring of tumor response to therapy at the cellular level and, hence, contribute information not available from tumor volume measurements alone.

5. Conclusion

The aim of the study was to investigate the feasibility of using ^{18}F FDG in conjunction with small animal PET imaging to monitor tumor metabolic response to therapy in a mouse (ER+) breast cancer model. The MC7-L1 and MC4-L2 tumor cell lines were selected since they both grow well in normal mice and retain their ER content in vivo. In mice undergoing chemo- or hormonotherapy it was found that ^{18}F FDG tumor uptake was reduced after 1 day, particularly with doxorubicin but fluctuated afterwards with a trend for decreasing activity 14 days after treatment initiation. This was associated with a slower increase in tumor size. Furthermore, ^{18}F FDG uptake was found to be sensitive to the areas of ischemia and reduced metabolism within the tumor that are not accounted for by volume measurements alone. Our results confirm the feasibility of using microPET to image tumor metabolism and response to therapy in mouse models, and indicate that it can provide unique information to studies aimed at developing new therapeutic approaches to breast cancer.

⁵ The reference tissue were less affected by the blood glucose level as compare to the tumors.

Table 1 Experimental design for the investigation of the effect of coprophagia and the presence of tumors on glycemia.

Conditions	Control	Tumor	Coprophagia	No Coprophagia
Food	X			
Water	X	X	X	X
Tumors		X		
Wooden chips floored cage	X	X	X	
Wire mesh floored cage				X

Five mice were used in each condition.

Table 2 Experimental design for the therapeutic interventions.

Therapeutic Intervention	Experimental Groups	Treatments	Number of mice
None	Controls	none	9
Chemotherapy	Doxorubicin	10 mg/kg day 0 ^a ; (iv) ^b	9
	Doxorubicin	5 mg/kg day 0 and day 7 (iv)	6
	Methotrexate	12 mg/kg day 0 (iv)	6
Hormonotherapy	Letrozole	5 mg/kg daily for 14 days (or) ^b	6

^a Following baseline PET imaging.

^b iv = intravenous, or = oral.

Table 3. Effect of the therapeutic regimens on tumor volume and metabolism.

	¹⁸ FDG Uptake %ID/g ¹ (sem)				Volume mm ³ (sem)			
	0	1	7	14	0	1	7	14
	MC7-L1							
Control	9.92 (0.68)	11.65 (1.05)	12.25 (0.88)	11.55 (0.73)	136.07 (17.55)	151.12 (19.29)	406.33 (72.79)	818.38 (127.88)
Doxorubicin ²	12.15 (0.60)	9.74 (0.76)	10.44 (0.42)	8.41 (0.41)	176.48 (103.43)	188.13 (118.15)	210.31 (121.96)	363.65 (183.41)
Doxorubicin ³	11.92 (1.40)	10.48 (0.65)	16.82 (2.25)	10.45 (0.64)	142.79 (26.96)	134.51 (28.71)	112.97 (21.47)	82.88 (16.47)
Methotrexate ⁴	12.01 (1.2)	11.41 (0.50)	11.50 (0.66)	9.26 (1.68)	165.48 (21.91)	171.95 (22.44)	376.35 (57.19)	596.15 (94.67)
Letrozole ⁵	12.49 (1.08)	10.51 (0.91)	12.04 (1.05)	10.04 (0.30)	143.97 (30.72)	151.66 (31.80)	262.78 (64.62)	412.94 (106.77)
	MC4-L2							
Control	9.56 (0.42)	11.01 (0.76)	10.90 (0.72)	10.01 (0.37)	106.05 (12.04)	113.48 (13.86)	246.15 (35.03)	592.61 (64.28)
Doxorubicin ²	12.09 (0.64)	9.41 (0.60)	10.10 (0.42)	8.31 (0.55)	153.39 (17.21)	161.06 (17.25)	171.83 (23.48)	274.12 (33.65)
Doxorubicin ³	10.78 (1.20)	10.75 (1.14)	12.64 (1.01)	10.25 (1.42)	214.44 (38.31)	228.64 (39.74)	209.81 (37.23)	165.38 (23.46)
Methotrexate ⁴	11.72 (1.43)	10.63 (0.68)	12.34 (1.11)	9.37 (1.66)	133.40 (20.37)	144.25 (21.50)	378.40 (81.65)	565.38 (84.84)
Letrozole ⁵	11.44 (0.61)	10.10 (0.82)	10.31 (0.53)	10.55 (0.94)	115.45 (19.39)	127.06 (18.24)	246.74 (78.07)	464.95 (112.03)

(1) Average percent injected dose per gram (%ID/g) and standard error of the mean (sem) for the tumor following intravenous injection of ^{18}F FDG. (2) Doxorubicin regimen, 10 mg/kg i.v. on day 0. (3) Doxorubicin regimen 5 mg/kg i.v. at day 0 and day 7. (4) Methotrexate 12 mg/kg i.v. on day 0. (5) Letrozole 5 mg/kg/day each day for 14 days, oral.

Figures legends.

Figure 1. Tumor ^{18}F FDG uptake as a function of the blood glucose level for tumors MC7-L1 and MC4-L2.

Figure 2. Average blood glucose level and standard error of the mean (sd) following food removal in a group of 10 mice.

Figure 3. Bar and error (sem) graphs comparing the average blood glucose level in animals fasted for 17 hours in (A) wood chip lined cage (n=5) or wire-mesh floor cage (n=5) to prevent coprophagia and (B) in tumor free (n=5) or tumor bearing mice (n=5).

Figure 4. Average percent change in tumor volume and sem following therapeutic interventions. Upper panel: MC7-L1; lower panel: MC4-L2. Percent change = $((\text{Volume}_{\text{day } n} - \text{Volume}_{\text{day } 0}) / \text{Volume}_{\text{day } 0}) \times 100$.

Figure 5. Average percent change in tumors metabolic activity (^{18}F FDG) following therapeutic interventions. Upper panel: MC7-L1; lower panel: MC4-L2. The error bar (sem) are only shown for the control group to improve the graph readability.

Figure 1.

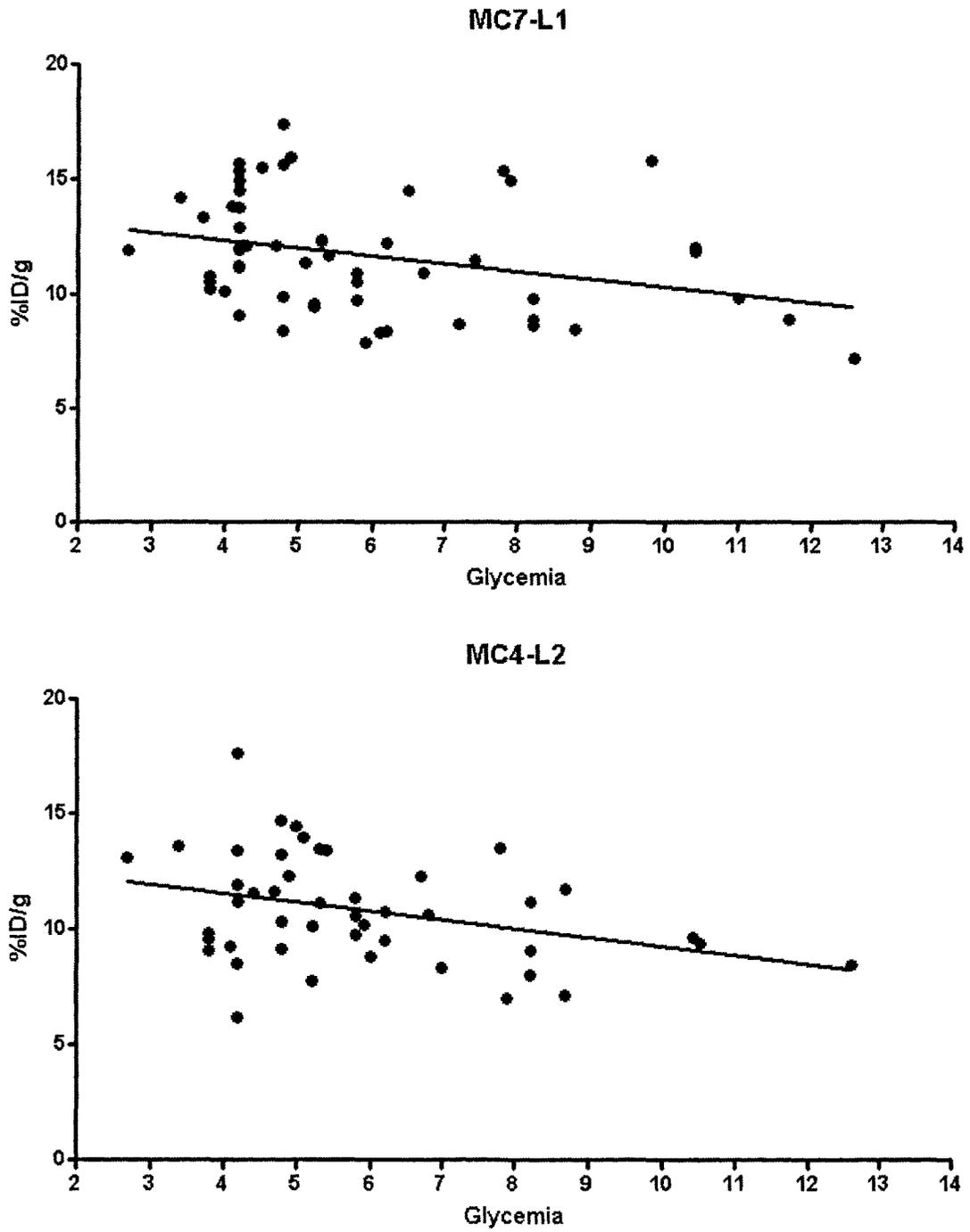


Figure 2.

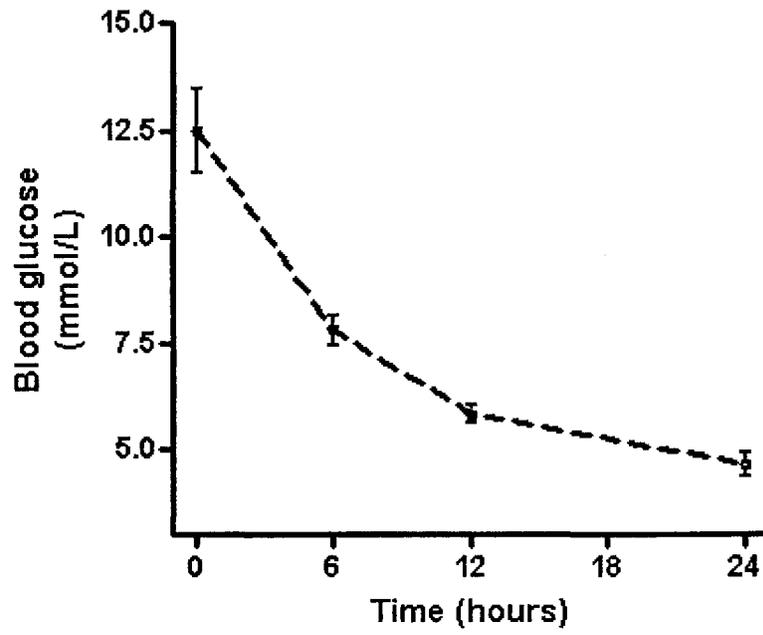


Figure 3.

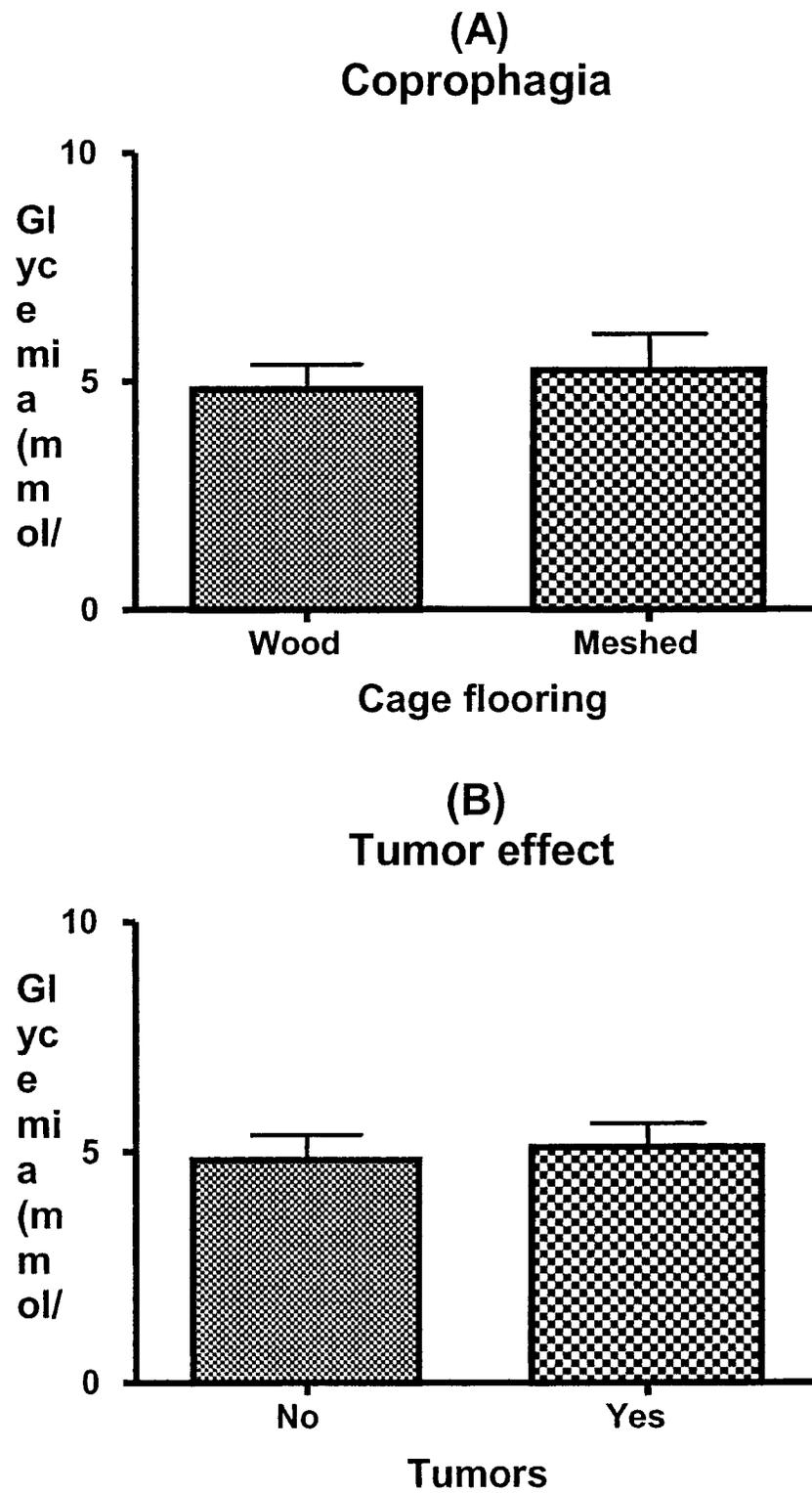


Figure 4

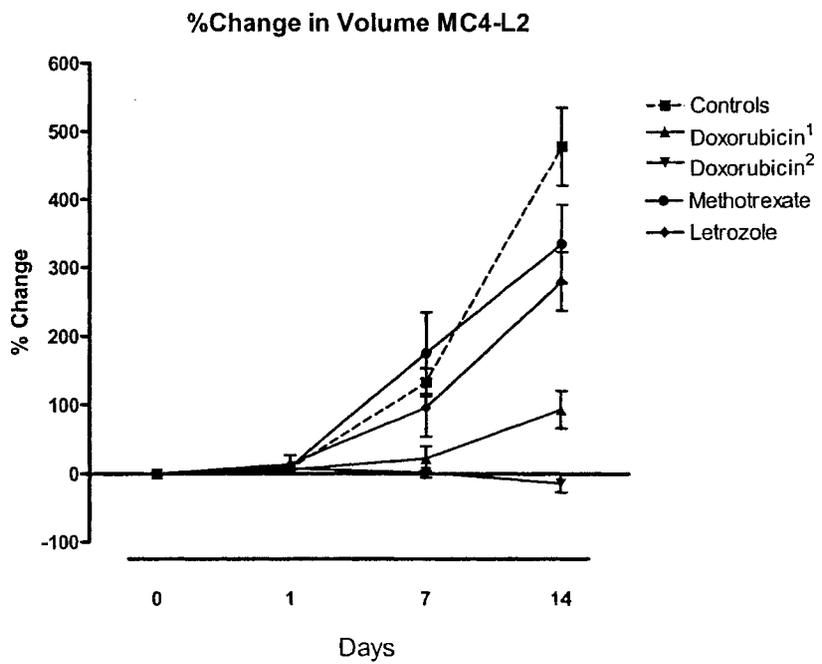
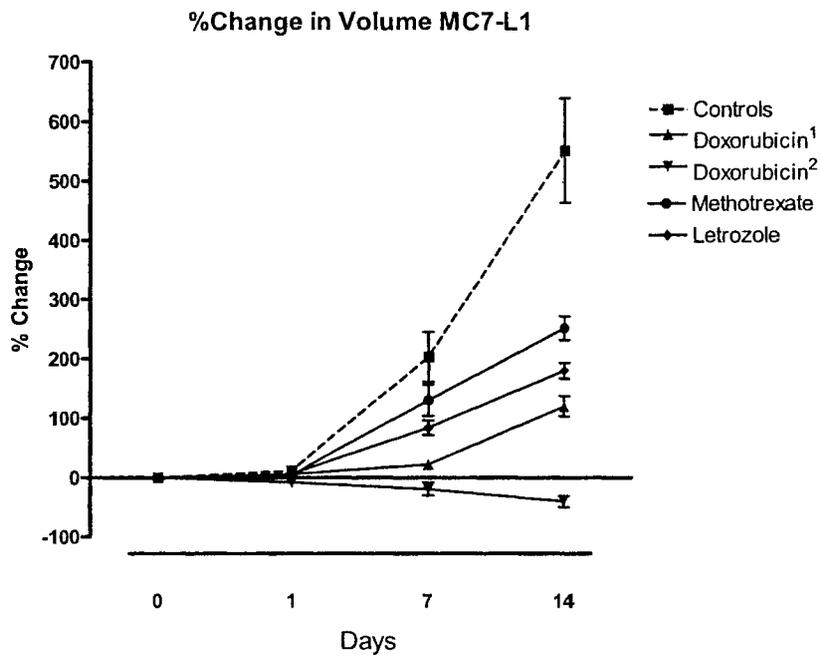
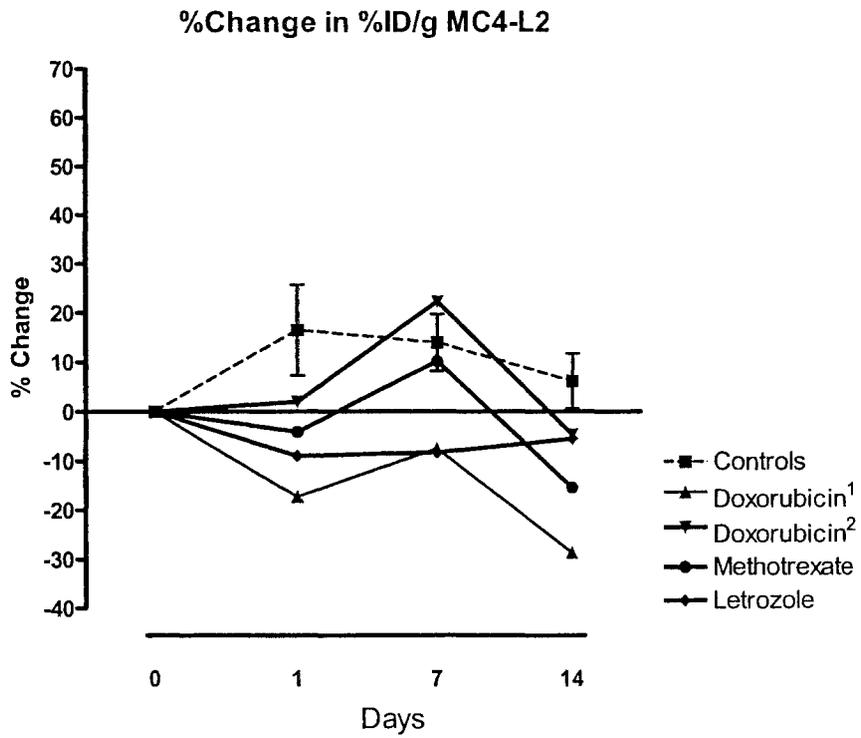
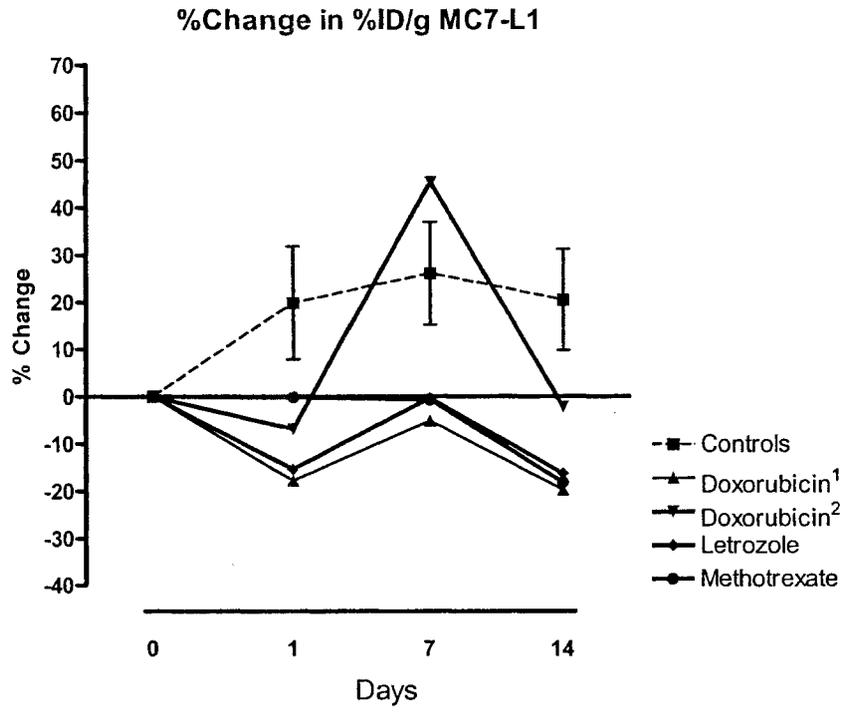
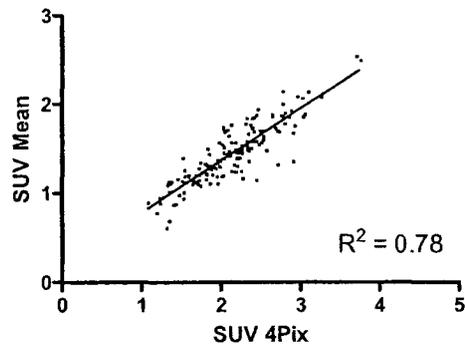
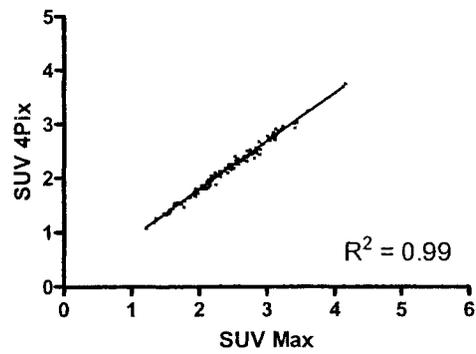
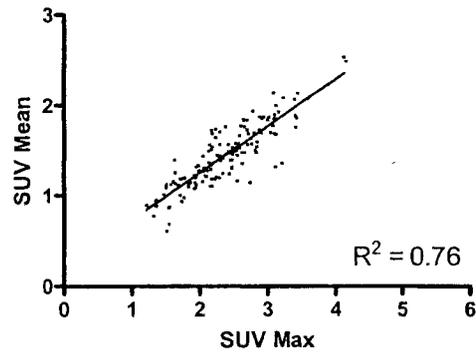


Figure 5

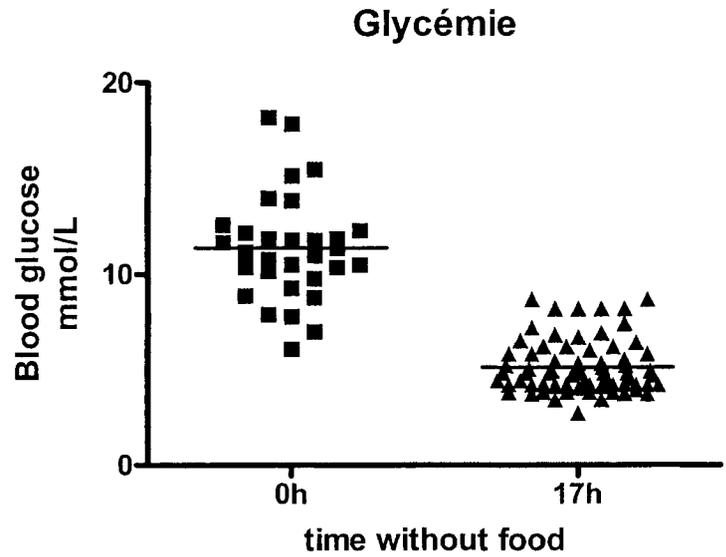


Appendix

Results that were not included as such in the article but that may be relevant for the discussion.



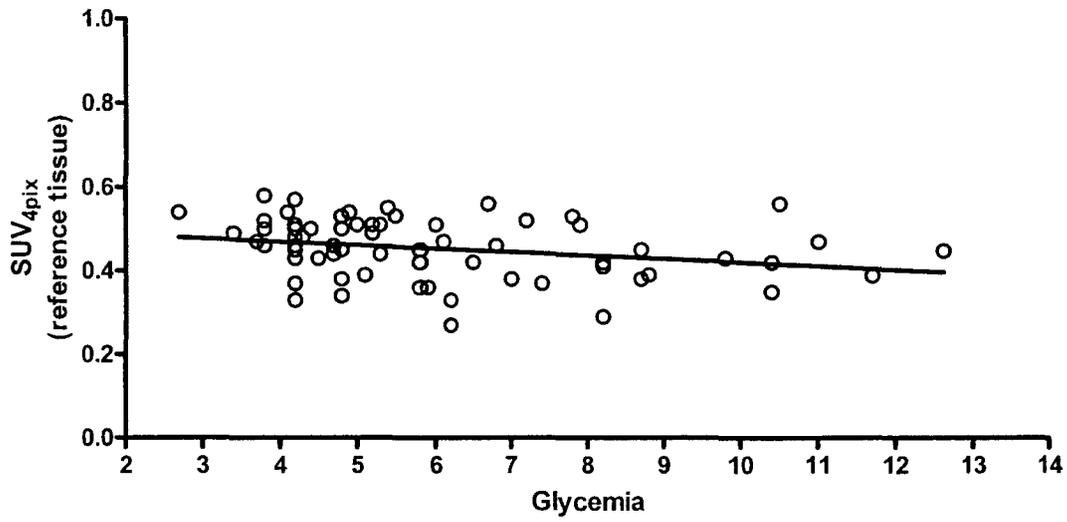
Appendix Figure 1 The SUV_{4pix} was chosen, as the basis for the computation of the % ID/g because it is less sensitive than the SUV_{mean} to the ROI delimitation and it is more robust against random variations in pixel activity as compared to SUV_{max} . The correlation was higher between the SUV_{max} and SUV_{4pix} as compared to their correlation with SUV_{mean}



Appendix Figure 2. Comparing the blood glucose level between animals that have free access to food and those that have been fasted for 15 hours. The average blood glucose is significantly lower ($P < .01$, Independent Student-t test) for the fasted group. Their %CV is however similar.

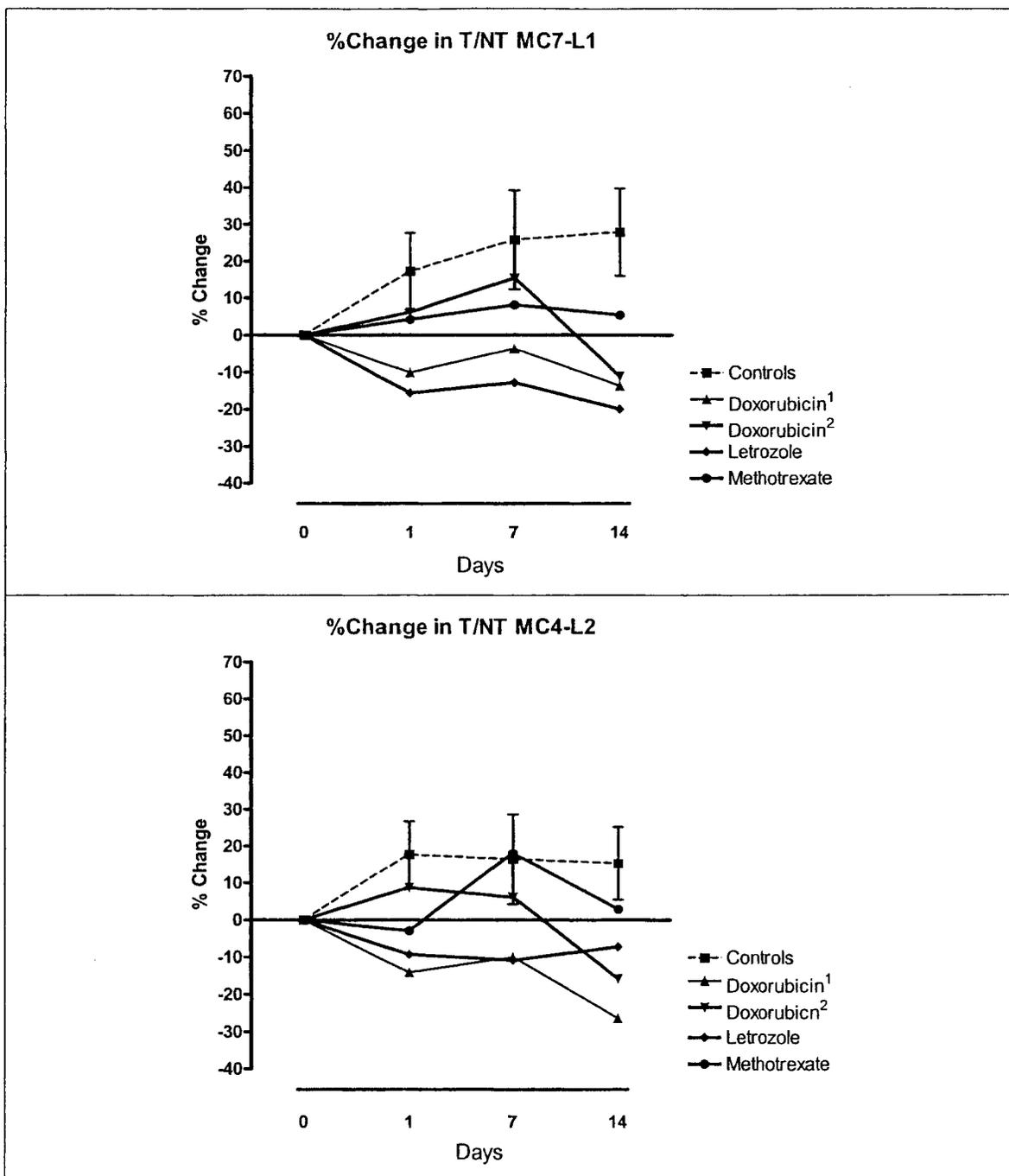
Data: Free access to food : Mean = 11.39, sdm 2.80, n = 31, %CV = 24%.

Fasted for 15 hours: Mean = 5.10, sdm 1.37, n = 74, %CV = 27%



Appendix Figure 3. There is a significant inverse relationship between the blood glucose level and the uptake of ¹⁸FDG by the reference tissue.

Linear regression. Slope -0.008; Intercept 0.51; $R^2 = 0.07$; p 0.03.



Appendix Figure 4. Average percent change in tumors to reference tissue $SUV_{4Pixels}$ values following therapeutic interventions. Upper panel MC7-L1 lower panel MC4-L2. The errors bar (sem) are only shown for the control group to improve the graph readability.

References

- Aliaga A. Rousseau J. A., Ouellette R., Cadorette J., van Lier J. E., Lecomte R. and Bénard F. Breast cancer models to study the expression of estrogen receptors with small animal PET imaging. *Nuclear Medicine and Biology* 2004;31:761-770.
- Bombardieri, E. and Crippa, F. PET imaging in breast cancer. *Q J Nucl Med* 2001;45:245-56.
- Croteau, E., Bénard, F., Gauthier, M., Cadorette, J., Aliaga, A., Bentourkia, M., and Lecomte, R. Quantitative gated PET for the assessment of left ventricular function in small animals. *J Nucl Med* 2003;44:1655-61.
- Erin L. Volk, Kristin Rohde, Myung Rhee, John J. McGuire, L. Austin Doyle, Douglas D. Ross, and Erasmus Scheider, Methorexate Cross-Resistance in a Mitoxantrone-selected multidrug-resistant MCF-7 Breast cancer line is attributable to Enhanced Energy-dependent Drug Efflux, *Cancer Res* 2000;60 : 3514-3521, July 1,
- Hamacher, K., Coenen, H. H., and 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;27:235-8
- Keyes J. W. SUV: Standard uptake or silly useless value. *J Nucl Med* 1995; 36:1836-1839.
- Lanari, C., Luthy, I., Lamb, C. A., Fabris, V., Pagano, E., Helguero, L. A., Sanjuan, N., Merani, S., and Molinolo, A. A. 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.
- Lapointe, D., Brasseur, N., Cadorette, J., La Madeleine, C., Rodrigue, S., van Lier, J. E., and Lecomte, R. High-resolution PET imaging for in vivo monitoring of tumor response after photodynamic therapy in mice. *J Nucl Med* 1999;40:876-82.
- Lecomte, R., Cadorette, J., Richard, P., Rodrigue, S., and Rouleau, D. Design and engineering aspects of a high resolution positron tomograph for small animal imaging. *IEEE Trans Nucl Sci* 1994;41:1446-52.
- Lecomte, R., Cadorette, J., Rodrigue, S., Lapointe, D., Rouleau, D., Bentourkia, M., Yao, R., Msaki, P., and Schmutz, G. Initial results from the Sherbrooke avalanche photodiode positron tomograph. *IEEE Trans Nucl Sci* 1996;43:1952-7.
- M Dowsett, Overexpression of HER-2 as a resistance mechanism to hormonal therapy for breast cancer, *Endocrine-Related Cancer* 2001;8 : 191-195.

- Marriott, C. J., Cadorette, J. E., Lecomte, R., Scasnar, V., Rousseau, J., and van Lier, J. E. High-resolution PET imaging and quantitation of pharmaceutical biodistributions in a small animal using avalanche photodiode detectors [see comments]. *J Nucl Med* 1994;35:1390-6.
- Clarke R., Leonessa F., Welch J. N. and Skaar T. C. Cellular and molecular Pharmacology of Antiestrogen Action and Resistance, *Pharmacol Rev* 2001;53:25-71.
- Selivanov, V., Picard, Y., Cadorette, J., Rodrigue, S., and Lecomte, R. Detector response models for statistical iterative image reconstruction in high resolution PET. *IEEE Trans Nucl Sci* 2000;47:1168-75.
- Spaepen K., Stroobants S., Dupont P. Bormans G., Balzarini J., Verhoef G., Mortelmans L., Vandenbergne P. and De Wolf-Peeters C. (18F) FDG PET monitoring of tumour response to chemotherapy: does (18F) FDG uptake correlate with the viable tumour cell fraction? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2003) 30:682-688.
- Tomayko, M. M. and Reynolds, C. P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology* 1989;24:148-54.
- Yoshioka T., Takahashi H., Oikawa H., Maeda S., Ido T., Akaizawa T., Fukuda H. and Kanamaru R. Influence of chemotherapy on FDG uptake by human cancer xenografts in nude mice. *J Nucl Med* 1997;38:714-717.

IV. DISCUSSION

Au Canada, le cancer du sein tient la deuxième place parmi les cancers entraînant la mort. Il se distingue comme la maladie la plus répandue chez la femme: 21,200 nouveaux cas de cancer du sein seront diagnostiqués cette année au Canada et 5,300 d'entre eux engendreront la mort. On estime, de surcroît, qu'avec le vieillissement de la population, le cancer du sein touchera de plus en plus de femmes d'ici dix ans (Société canadienne du cancer). Il est donc primordial de mettre sur pied des stratégies efficaces de dépistage, afin d'établir rapidement un pronostic et de prescrire le traitement adéquat.

Tout d'abord, on sait que les tumeurs mammaires peuvent posséder des récepteurs d'œstrogène (RE). On sait aussi que celles qui en sont munies croissent plus lentement que les autres. Or, dans environ 65 % des cas, et surtout chez les femmes postménopausées, les tumeurs comportent des RE. En matière de dépistage, on arrive, avec la mammographie, à détecter la présence de tumeurs, mais il nous est impossible de savoir si elles sont pourvues de RE ou non. Pour y arriver, il faut recourir à la biopsie, qui entraîne elle-même des inconvénients : cette méthode est traumatisante et ne peut être utilisée dans certains cas de récidives ou de métastases. En outre, la biopsie ne nous renseigne pas sur les modifications que les récepteurs peuvent subir au cours de l'évolution de la maladie.

La TEP est une technique d'imagerie non-invasive permettant la quantification *in vivo* des RE et le suivi du métabolisme de la tumeur. Le FES, un analogue de l'œstradiol, est utilisé pour visualiser les RE tandis que le FDG sert à évaluer le métabolisme de la tumeur. Ainsi, la TEP fournit des données expérimentales réalistes sur le comportement de la tumeur, ce qui permet de mieux estimer l'efficacité de la thérapie. Enfin, utilisée à des fins de recherche expérimentale, la TEP permet de réduire considérablement le nombre d'animaux requis puisque le même animal peut être examiné plus d'une fois lors d'études de suivi.

1. ÉNONCÉ DES RECHERCHES

Le métabolisme des tumeurs traitées par chimiothérapie et par hormonothérapie étant peu connu, nos recherches consistaient à trouver un modèle de cancer du sein se comportant *in vivo* comme une tumeur avec RE ainsi qu'à déterminer les conditions optimales permettant son imagerie par TEP. Le modèle ainsi établi pourra servir à évaluer de nouveaux radiotraceurs, comme les dérivés du FES, pour mesurer la présence de RE ou à évaluer l'efficacité de diverses thérapies.

Pour trouver un modèle de cancer correspondant à nos besoins, nous avons d'abord vérifié si les lignées de cellules cancéreuses humaines (adénocarcinomes) que nous avons choisies et greffées sur les souris, exprimaient des RE. Nous

avons ensuite refait les expériences avec des cellules cancéreuses de souris (carcinomes de souris), puis nous avons testé leur réponse aux traitements de chimiothérapie et d'hormonothérapie déjà existants. Nous avons comparé les taux de croissance, la conservation des RE, la viabilité des tumeurs et leur concentration en RE.

2. ADÉNOCARCINOMES MAMMAIRES (Xénogreffes)

Nous avons réalisé les xénogreffes avec les lignées de cellules MCF-7 et T-47D, toutes deux RE+. Comme cellules de référence nous avons utilisé MBA-MB-231. Ces modèles sont bien connus, ayant été étudiés par plusieurs laboratoires dans le passé. Les cellules provenaient de la compagnie American Type Culture Collection (ATCC).

La première étape consistait à nous assurer que les adénocarcinomes MCF-7 et T-47D comportaient bien des RE, contrairement aux MBA-MB-231. Pour ce faire, nous avons mis en pratique le protocole de cinétique de liaison *in vitro* (annexe I) prescrivant l'œstradiol marqué au Tritium. Ensuite, nous avons entamé la partie *in vivo*.

Les premières greffes ont été pratiquées sur des souris immunodéficientes Nu/nu (SCID). Les taux de croissance des cellules MCF-7 et T-47D étant plutôt lents et semblables, nous avons décidé de poursuivre avec les MCF-7 seulement.

Pour tenter d'améliorer le taux de croissance, nous avons refait les expériences avec des souris immunodéficientes Nu/nu (NIH-III), mais le taux de croissance était toujours bien inférieur à celui obtenu avec les MBA-MB-231. Quelle en était la raison?

Lors de nos expériences *in vivo*, nous avons noté certains faits. Chez l'humain les tumeurs se développent rapidement et déclenchent une réaction immunitaire associée à une captation accrue de FDG. Chez les souris immunodéficientes, les MCF-7 ne se multiplient que très lentement et nécessitent l'implantation de capsules d'œstradiol pour se développer, ce qui n'est pas sans inconvénient. Nous pensons que la faible captation du FES observée dans les cellules MCF-7 serait due à l'utilisation des capsules d'œstradiol et que ce dernier pourrait se fixer aux récepteurs intracellulaires, empêchant ainsi toute liaison avec le FES. De plus, les capsules ayant été laissées longtemps dans le corps de l'animal, l'œstradiol pourrait demeurer fixé au récepteur, même après leur retrait. Nous avons évalué ces possibilités trois jours après avoir retiré les capsules et nous avons observé une absence d'œstradiol dans le sang ainsi qu'une biodistribution semblable au FES. Par conséquent les capsules d'œstradiol ne seraient pas en cause. Les résultats indiquent que les MCF-7 perdent *in vivo* une certaine quantité de leurs récepteurs. Ce constat a été corroboré à la fois par imagerie TEP (Annexe II), qui indiquait une faible captation du FES, par biodistribution et par immunohistochimie.

Cela étant, en ce qui concerne les adénocarcinomes MCF-7, nous pouvons conclure que contrairement aux données obtenues *in vitro*, les expériences *in vivo* donnent des images peu satisfaisantes et peu fiables en raison de la faible captation du FES résultant de la perte des RE. La lignée de cellules que nous avons utilisée était hétérogène et seulement un certain pourcentage des cellules contenait des RE. Nous pensons que les cellules ne possédant pas de récepteurs se sont développées plus rapidement *in vivo* que les cellules RE+ résultant en une tumeur qui était en majorité dépourvue de RE. Une hypothèse sur la perte des RE *in vivo*, repose sur le fait que nous ayons utilisé deux lignées de souris Nu/nu. Peut-être faudrait-il utiliser une autre sorte de souris immunodéficiente. Toutefois, nous croyons que le problème réside plutôt dans la lignée de cellules tumorales qui présente un manque d'angiogénèse. Plusieurs chercheurs ont utilisé le même adénocarcinome pour tester l'hormonothérapie dans le passé, mais compte tenu de la variabilité des taux de croissance de cette lignée de cellules tumorales, on peut se questionner sur la validité des résultats obtenus.

En effet, d'autres chercheurs ont aussi observé un faible taux de croissance chez les adénocarcinomes MCF-7, également obtenus de la compagnie ATCC (Guo et al., 2003), et des contradictions ont été constatées dès les années 1980 avec les premières souches de MCF-7 (Jordan et al., 1989). Osborne (Osborne, et al., 1987) a rapporté que le comportement hormonal des cellules MCF-7 varie d'un laboratoire à l'autre. Ajoutons, que dernièrement, des cellules MCF-7 génétiquement modifiées ont été développées, présentant des taux de croissance

plus rapides et une plus grande sensibilité à l'hormonothérapie (Brodie et al., 2003; Guo et al., 2003). Pour différentes raisons, nous n'avons cependant pas évalué cette nouvelle lignée cellulaire, en particulier parce que les cellules sont nouvelles sur le marché. Par contre, le laboratoire doit évaluer les cellules envoyées par Osborne afin de déterminer si elles contiennent des RE et de comparer les résultats avec ceux que nous avons obtenus avec les autres cellules.

3. CARCINOMES MAMMAIRES DE SOURIS

En ce qui a trait aux lignées de carcinomes de souris, nous en avons choisi trois provenant d'Argentine: les MC7-L1, MC4-L2 et MC4-L3. Comme dans le cas des adénocarcinomes humains, nous avons vérifié *in vitro* la présence de RE selon le protocole de cinétique de liaison (annexe I). Nous avons constaté que les trois lignées contenaient des RE.

Pour quantifier la captation tumorale des traceurs, nous avons effectué des études de biodistribution *in vivo* et des études d'imagerie TEP à l'aide de FDG et du FES. Pour l'évaluation de la captation tumorale par TEP, nous avons défini des régions d'intérêt (ROI) autour de la tumeur sur les images pour calculer les SUV. Nous avons préféré le SUV_{4pix} , aux SUV_{max} et aux $SUV_{moyenne}$ car ce paramètre est moins sensible aux variations aléatoires d'activité observées dans les ROI.

Nos expériences *in vivo*, réalisées sur des souris normales Balb/c, nous ont confirmé que les cellules MC4-L3 nécessitent de la Medroxy Progesterone Acetate

(MPA) pour croître rapidement. Comme nous craignons que la MPA n'interfère avec les médicaments utilisés en chimiothérapie et en hormonothérapie, nous avons retiré les MC4-L3 de notre projet. Après comparaison de leurs taux de croissance avec ceux des adénocarcinomes MCF-7 obtenus dans notre laboratoire, nous estimons que les lignées MC7-L1 et MC4-L2 représentent la meilleur modèle car elles croissent rapidement sans ajout d'œstradiol.

Par ailleurs, les souris Balb/c n'expriment pas la protéine plasmatique SHBG (Sex Hormone Binding Globulin). Chez l'humain, cette protéine se lie spécifiquement aux androgènes et aux œstrogènes. Comme ses fonctions incluraient le transport des œstrogènes aux organes riches en RE, il convient de se demander si cette protéine ne pourrait pas influencer sur la distribution d'un radiotraceur comme le FES. Bien que l'importance de la SHBG nous paraisse non négligeable dans nos recherches, nombre de questions demeurent sur sa véritable fonction et son mode d'action (Strel'chyonok et Awakumov, 1990; Hryb et al., 1990). Il serait important que les études futures incluent un test *in vitro* de liaison au SHBG, mais ce test n'était pas encore disponible dans nos laboratoires au moment où nous avons effectué notre étude. Toutefois, même en l'absence de test pour les SHBG, nous pouvons tout de même obtenir de l'information essentielle sur le métabolisme et l'affinité de ces produits pour les récepteurs œstrogènes.

Pour ce qui est des résultats obtenus par TEP, ils permettent d'établir une corrélation entre la captation de FDG et le taux de croissance rapide des

carcinomes MC7-L1 et MC4-L2. Nous avons aussi observé une bonne corrélation entre la présence de RE dans ces cellules et la fixation du FES. En outre, la captation du FES dans ces tumeurs mammaires était corroborée par la biodistribution et correspond à leur concentration en RE, mesurée *in vitro*.

Les modèles MC4-L2 et MC7-L1 répondent bien à chimiothérapie (DOX et MTX) et à l'hormonothérapie inhibitrice d'aromatases (LET et EXE) et des anti-œstrogènes (TAX et RAL). Nous l'avons constaté en mesurant l'augmentation du volume des tumeurs en mm³. Nous savons qu'à doses identiques, le RAL agit mieux que le TAX. Si on double la dose du RAL, le volume de la tumeurs diminue. Par contre, lorsqu'on double la dose de TAX (8 mg/kg/jour à 16 mg/kg/jour), cela a un effet de perte d'inhibition de croissance de la tumeur. Cet effet peut être attribué à une stimulation de la croissance par l'agoniste partiel. Pour ce qui est de l'inhibiteur d'aromatase stéroïdien EXE avec 5 mg/kg/jour, il est efficace pour ralentir la croissance de la tumeur MC7-L1; cependant, à 25 mg/kg/jour, la croissance augmente.

L'agoniste partiel TAX est reconnu pour stimuler certains cancers du sein chez les souris (Osborne,1993) et L'EXE est un stéroïde qui occasionne des effets secondaires androgènes chez l'humain (Buzdar et al., 2002). Il est possible qu'à fortes doses, les deux médicaments provoquent un effet œstrogénique. De plus, Osborne ayant étudié les adénocarcinomes MCF-7, a trouvé que le TAX peut

stimuler la tumeur pour un certain temps, pour ensuite entraîner sa réduction, et ceci même à fortes doses (Osborne et al., 1985).

La variété des réactions à l'hormonothérapie, sans considération des lignées de cellules, justifie des recherches plus poussées et peut offrir d'intéressants modèles d'étude de la résistance des tumeurs à d'autres médicaments en hormonothérapie.

En conclusion, les lignées MC7-L1 et MC4-L2 des souris Balb/c constituent de bons modèles de recherche car elles permettent d'évaluer l'expression des RE *in vivo*, et elles croissent plus rapidement que les xénogreffes mammaires chez les souris immunodéficientes. Donc, d'excellentes images quantitatives de l'activité métabolique des tumeurs (avec FDG) et de l'expression de leurs RE (avec FES) peuvent être obtenues avec la TEP. Cela dit, comme elles répondent différemment aux divers agents chimiothérapeutiques et hormonothérapeutiques, elles peuvent servir à étudier la résistance des tumeurs de futurs médicaments.

4. EFFET DE LA GLYCÉMIE ET DE LA THÉRAPIE SUR LA CAPTATION DU FDG

Dans cette étude, nous avons examiné plus en détail les paramètres pouvant influencer sur la captation de FDG. Nous avons aussi comparé la captation de FDG avec le volume tumoral en utilisant le protocole d'imagerie décrit à l'Annexe III.

La captation de FDG a été exprimée en pourcentage des doses injectées par gramme de tissu (%DI/g), car ce sont les unités normalement utilisées dans le cadre d'études sur les animaux. Les valeurs de %DI/g ont été calculées à partir des valeurs de captation standardisées (Standardized Uptake Value ou SUV). Les SUV dépendent de six principaux paramètres énoncés par Keyes (Keyes, 1995). Il s'agit du poids de l'animal, de la taille de la lésion, de la résolution de la caméra, de la durée d'acquisition (doit être constante), de la pharmacocinétique du traceur et de la glycémie.

Si ces paramètres sont souvent difficiles à contrôler en clinique, ils peuvent aisément être normalisés au moment des expériences avec les animaux. D'une part, il est facile de se procurer des animaux de même race, sexe, âge et poids; d'autre part, on peut choisir la taille de la tumeur pour réduire au minimum l'effet de volume partiel. Bien que l'effet de volume partiel soit minime, nous en avons tenu compte dans nos calculs étant donné la petite dimension des tumeurs greffées chez la souris par rapport à la résolution de la caméra TEP utilisée (Lecomte et al, 1996).

Puisque nous avons observé que le taux de glucose plasmatique diminue la captation tumorale du FDG, nous avons essayé de normaliser le mieux possible la glycémie de nos animaux. Pour ce faire, tous les animaux ont été mis à jeun quinze heures avant l'imagerie. Par contre, il existait une possibilité de

coprophagie et un effet possible de la présence de la tumeur sur la glycémie. Pour vérifier l'effet de ces deux facteurs nous avons effectué l'expérience suivante.

Nous avons d'abord réparti les souris en quatre groupes: le premier, formant un groupe de référence, étaient des souris normales placées dans une cage conventionnelle avec accès à la nourriture; le second groupe, aussi formé de souris normales, était placé dans une cage métallique dont le grillage empêchait les animaux d'avoir accès à leurs excréments; deux autres groupes, formés de souris ayant subi l'implantation de tumeurs MC7-L1 et MC4-L2, ont été placés dans des cages conventionnelles, avec possibilité de coprophagie.

Outre une absence d'effet de la coprophagie chez les souris ayant accès à leurs excréments, nous avons observé des taux de glucose équivalents chez toutes les souris, même celles qui étaient porteuses de tumeurs. Malgré le fait que les animaux aient jeûné pendant quinze heures, nous avons noté une grande variabilité des valeurs de glycémie au moment de l'imagerie. Ces différences de glycémie n'étant pas liées à la coprophagie ou à la présence de tumeurs, elles découlent possiblement des variations normales suite au jeûne subi par les souris avant la mesure de la captation. Une autre hypothèse serait que ces variations résultent du stress que les souris ont pu vivre lors de la préparation pour les mesures TEP, ce qui est difficile, voire impossible, à vérifier en pratique.

Pour vérifier les effets de la chimiothérapie (voie intraveineuse) et de l'hormonothérapie (gavage), nous avons séparé aléatoirement en quatre groupes les souris porteuses des tumeurs MC7-L1 et MC4-L2. Tous les groupes ont été étudiés pendant quatorze jours : l'un avec 10 mg/kg de DOX au jour 0, un autre avec deux injections de 5 mg/kg de DOX (jour 0 et jour 7), un autre avec 12 mg/kg au jour 0 de MTX et l'autre avec 5 mg/kg/j de LET. Ces quatre groupes ont à chaque fois été mis à jeun quinze heures avant la prise de la mesure TEP. De plus, afin d'uniformiser les conditions de captation, nous avons toujours laissé s'écouler une heure entre l'injection de FDG et l'acquisition, il faut aussi mentionner que toutes les souris demeuraient endormies durant cette période.

La mesure du volume de la tumeur constitue une donnée globale de la réponse de la tumeur à la thérapie et ne discrimine pas les régions nécrosées ou touchées par l'hypoxie. Par ailleurs, à partir des images produites par la TEP, il est possible de calculer les SUV en vue d'évaluer spécifiquement l'activité métabolique des cellules les plus vigoureuses, lesquelles permettent souvent à la tumeur de se régénérer et de former des métastases. Si deux injections de 5 mg/kg de DOX amènent un ralentissement de l'activité métabolique des cellules, elles sont tuées plus efficacement avec une seule injection de 10 mg/kg de DOX. Cela montre que la captation de FDG mesurée par la TEP permet non seulement de suivre la réponse des cellules cancéreuses face à une thérapie, mais d'obtenir des renseignements que les mesures seules du volume de la tumeur ne peuvent offrir.

V. CONCLUSION

Après réalisation des expériences et analyse des résultats, nous pouvons tirer certaines conclusions.

- a) Les cellules humaines MCF-7, greffées sur les souris immunodéficientes, croissent lentement et perdent leurs récepteurs d'œstrogènes. En effet, le délai entre le moment du retrait de la capsule d'œstradiol et celui de la prise des images avec le TEP est suffisant pour qu'il ne reste plus d'œstrogènes résiduels. Cela a été confirmé par la mesure de la captation du FES et l'immunohistochimie.

- b) Les lignées de cellules MC4-L1 et MC7-L2 font de bons modèles de cancer du sein car elles ne nécessitent pas d'implantation de capsules d'œstradiol pour croître; elles croissent rapidement et conservent leurs récepteurs d'œstrogène *in vivo*; elles captent le FES grâce aux RE (ce qui est confirmé par la co-injection) et leur réponse à l'hormonothérapie et à la chimiothérapie correspond bien à celle des tumeurs mammaires humaines.

- c) Il existe une bonne corrélation entre les mesures prises avec l'imagerie TEP, la biodistribution et la quantification des récepteurs *in vitro*.

- d) Il est important de mettre les animaux à jeun quinze heures avant d'injecter le FDG afin de diminuer et d'uniformiser la glycémie. Ce contrôle de la glycémie favorise une meilleure captation de FDG pour la mesure du métabolisme tumoral.
- e) La coprophagie et la présence de tumeurs n'ont pas d'influence significative sur la glycémie
- f) Durant la thérapie, la captation du FDG demeure passablement constante, malgré la taille de la tumeur. Cela peut expliquer le fait que les tumeurs soient des systèmes métaboliquement hétérogènes. Le métabolisme cellulaire dépend de la perfusion et des caractéristiques des tumeurs et il peut varier dans le temps. Ainsi, au moment du traitement, les tumeurs ne répondront pas toutes de la même manière et l'agent thérapeutique n'y sera pas nécessairement distribué de façon homogène. Nous pouvons voir cette hétérogénéité sur les images TEP : certaines parties des tumeurs montrent une importante fixation de FDG et d'autres non. Selon nous, le paramètre le plus important est le potentiel que possède la tumeur de continuer à croître et à se disséminer dans l'organe et c'est ce que l'on mesure avec les SUV_{4pix} . C'est ce qui nous permet de déterminer l'effet du traitement sur les cellules les plus actives de la tumeur et celles qui sont les plus prédictives de l'évolution de la maladie.

- g) Les régions ischémiques et le métabolisme réduit à l'intérieur de la tumeur influent sur la captation du FDG. Dans l'ensemble les régions ischémiques vont affaiblir le métabolisme de la tumeur même si SUV_{4pix} ne tient pas compte des cellules hypoxiques. Cela peut peut-être expliquer la cause de la vascularité de la tumeur. Afin d'éviter l'apparition de régions ischémiques, un suivi de 10 jours plutôt que de 14 jours pourrait être réalisé avec la TEP sur les lignées de cellules MC4-L1 et MC7-L2. Le degré de captation de FDG pourrait ainsi être amélioré.
- h) Notre modèle de cancer mammaire de souris contenant des RE permet d'évaluer de nouveaux agents chimiothérapeutiques et hormonothérapeutiques ainsi que de nouveaux marqueurs du cancer du sein en vue d'une utilisation clinique.
- i) De nouveaux radiotraceurs avec émetteur de positrons sont à l'étude. Ceux-ci devraient permettre de mesurer les concentrations de HER-2 et de métalloprotéinase de la matrice cellulaire (MMP). Ces protéines sont également surexprimées dans les cellules tumorales du sein et peuvent être considérées comme des cibles potentielles pour l'imagerie TEP. Donc, il s'agirait de vérifier *in vivo* si les modèles MC4-L1 et MC7-L2 expriment bien des HER-2 et des MMP.

j) Comme autre avenue possible d'investigation notons la combinaison de thérapies, par exemple, avec anti-HER-2 et anti-RE ou chimiothérapie et hormonothérapie.

VI. ANNEXES

Annexe I

CINÉTIQUE DE LIAISON DU ³H-ESTRADIOL AUX MCF-7, T-47D, MDA-MB-231, MC4-L1, MC7-L2 et MC4-L3

Protocole selon *Eur J Cancer Oncol* 21 (8) : 965-973 (1985) et aussi *Cancer Research* 43 : 3534-3538 (1983)

Ensemencer les cellules d'un flacon 75 mm² dans 6 plaques / 6 puits (diluer les cellules pour que chaque puits contienne 2 ml (donc, 1 flacon dans 75 ml total). Le milieu à utiliser est le RPMI 1640 complet (ou équivalent) sans rouge de phénol (GIBCO #13200-076) et contenant 10% de sérum inactivé strippé (Bio-Média, magasin ; 0.25% charbon activé, 0.025% dextran). 6 plaques / 6 puits permettront de faire douze points de la courbe en triplicata.

Les cellules sont changées 1 seule fois après 5 jours.

Une fois les cellules à confluence (après 6-7 jours), elles sont lavées 1x avec 1,5 ml de PBS 1X 37°C, et 970 µl de milieu, exempt de FBS, est ajouté à chaque puits. Elles sont remises à 37°C le temps d'effectuer la dilution du 3H-estradiol.

Le ³H-estradiol est utilisé à 1nM finale (un stock de 6,67 x 10⁻⁸ doit être préparé si on met 15 µl dans le puits). Chaque temps est reproduit en triplicata. À chaque temps un contrôle de liaison non-spécifique doit être effectué en ajoutant 200x plus d'estradiol froid (15 µl).

Les cellules sont incubées à 37°C pendant différents temps (ex : 5, 10, 20, 30, 50, 70 min) jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint.

Une fois le temps écoulé, les cellules sont lavées avec 3 x 1,5 ml de PBS 1x à 4°C (utiliser une "repeat pipette" si possible). Au dernier lavage, bien aspirer la totalité du PBS et ajouter 1 ml d'éthanol dans chaque puits. Laisser reposer 25 minutes puis récolter 900 µl pour compter dans 5 ml de liquide à scintillation Ready Organic (Beckman # 586600 = 4x3.75 litres). Le comptage se fait avec le programme A11 au 6^e étage (5 minutes, totalité des spectres).

Une plaque de 6 puits supplémentaire est préparée dans le but de mesurer en duplicata le nombre de cellules dans les puits, le nombre de protéines (méthode Lowry; Bio-Rad) et pour l'extraction de l'ADN (méthode de Tripure).

Les résultats sont mis sur un graphique représentant la liaison du ³H-estradiol (fmoles/µg ADN ou fmoles/mg de protéines ou fmoles/million de cellules) en fonction du temps. Pour ce faire, préparer une courbe standard représentant le nombre de fmoles de ³H-estradiol en fonction du nombre de CPM pour pouvoir comparer avec la littérature.

Annexe II

Protocole expérimental : Imagerie des tumeurs hormonodépendantes chez la souris (Version : 1; Date : 21 mai 2002)	
A1 – Fait par : Antonio Aliaga	A3 - # Souris : Nu-nu / Balb-c
But : Identification des tumeurs hormonodépendantes avec ^{18}FES	A4 – Poids : 20 g

Préparation des cellules et inoculation chez les souris:

*Les cellules d'adénocarcinomes mammaires humains (MCF-7 et MDA-MB-231) et les cellules de carcinomes mammaires de souris (MC7-L1 et MC4-L2) sont implantées chez les souris Nu-nu et Balb-c, respectivement.

*Une quantité de 10×10^6 cellules seront injectées (0.1 ml/tumeur) de façon intradermique dans le flanc de l'animal.

*Attendre un délai minimum de douze semaines pour les souris Nu/nu et six semaines pour les souris Balb-c, pour faire des images.

MATÉRIEL :

- Les souris Nu-nu sont greffées avec deux tumeurs au niveau du thorax, dans le même plan que le cœur. Pour les souris Balb-c, les tumeurs sont implantées dans la cuisse.
- Saline physiologique NaCl 0.9 % avec héparine.
- 1 Papillon 30G Short (ligne veineuse).

- Kétamine-xylazyne 1ml/kg.
- ¹⁸FES.

PRÉPARATION AVANT CHAQUE SÉANCE D'IMAGERIE

Vérification de la caméra.

Orienter le scanner horizontalement.

Acquisition d'une mesure de normalisation.

Mesure d'atténuation.

Configurer les programmes d'acquisition sur la caméra.

PROCÉDURE :

[Hrs -0:20] Préparation

- 1) Identifier, peser la souris.
- 2) Endormir la souris sous K/X.
- 3) Installer une ligne veineuse 30G short sur la veine caudale.
- 4) Placer l'animal dans la caméra TEP.
- 5) Positionner l'animal pour que les tumeurs soient dans le champ de la caméra (laser).
- 6) Préparer la pompe à injection automatique, seringue de 0.1 ml (débit de 2 ml/min).
- 7) Installer une seringue de saline sur la pompe pour le volume de chasse ("flush").
- 8) Préparer le programme d'acquisition dynamique avec ¹⁸FES sur la caméra TEP.
- 9) Prélever ~200 – 400 µCi de ¹⁸FES (0.2- 0.4 ml).
- 10) Mesurer et noter la dose. Print: DOSE _____ Heure _____
- 11) Installer la seringue de ¹⁸FES sur la pompe pour l'injection dans la ligne veineuse.

12) Vérifier que l'animal est stable et noter les paramètres vitaux.

[Hrs 0:00] ¹⁸FES (mesure dynamique)

13) Lancer l'acquisition, puis l'injection de FES (activer la pompe) 2-3 secondes plus tard.

14) Aussitôt l'injection de ¹⁸FES terminée, lancer l'injection du salin.

15) Faire une acquisition dynamique de 45 minutes.

Pendant l'acquisition:

16) Noter les paramètres vitaux.

17) Retirer les seringues de la pompe.

18) Compter l'activité restante de ¹⁸FES dans la seringue.

DOSE _____ Heure _____ (PRINT).

FIN DE LA PROCÉDURE D'IMAGERIE DYNAMIQUE ¹⁸FES

[Hrs 1:00] ¹⁸FES (mesure de corps entier pendant 30 minutes) :

19) Programmer l'acquisition de volume corps entier (*3 positions de lit, double échantillonnage axial, sur 10 minutes, images statiques*).

20) Démarrer l'acquisition de volume (30 min).

Pendant l'acquisition:

21) Noter les paramètres vitaux.

[Hrs 1:30] ¹⁸FES (mesure de corps entier pendant 30 minutes) :

- 22) □ Programmer l'acquisition de volume corps entier (3 positions de lit, double échantillonnage axial, sur 10 minutes, images statiques).
- 23) □ Démarrer l'acquisition de volume (30 min).

FIN DE LA PROCÉDURE DE MESURE DE CORPS ENTIER AVEC ¹⁸FES

FIN DE LA SÉANCE D'IMAGERIE

- 24) □ Une fois que l'acquisition est terminée, on retire l'animal de la caméra.
- 25) □ Regrouper toute l'information dans un même fichier, noter les noms des fichiers, compléter et classer les dossiers.
- 26) □ 1.50 heure après chaque scan les souris seront sacrifiées pour faire une biodistribution conventionnelle et chaque organe servira au comptage de l'activité.
- 27) □ Les tumeurs seront analysées de façon histologique avec immunofluorescence.

TEP-FES

Inoculation des cellules	Dyn.	Corps entier
↓ 6 ou 12 sem.	↓ (45 min)	↓ (30 min) ↓ (30 min)

1.50h après scan : Dissection

Annexe III

Protocole expérimental 270502 : Imagerie tumorale du métabolisme (Version : 1; Date : 21 Avril 2002)	
A1 – Fait par : Antonio Aliaga	A3 - # Souris :
A2 - Date :	A4 - Poids :
A5 - Fichiers :	

But: La réponse au doxorubicine, méthotrèxate et létrozole

Préparation des cellules et inoculation chez les souris:

Les cellules tumorales (MC7-L1 et MC4-L2) sont implantées chez les souris femelles Balb/c.

Une quantité de 1×10^7 cellules seront injectées de façon intradermique dans le flanc de l'animal.

Attendre un délai minimum de 6 semaines pour faire les images au jour 0, puis traiter avec doxorubicine, méthotrèxate et l'hormonothérapie (létrozole) et prendre ensuite des images 1, 7, et 14 jours plus tard.

MATÉRIEL :

Les souris sont greffées avec deux tumeurs au niveau du thorax, dans le même plan que le cœur.

Saline physiologique NaCl 0.9 % avec héparine.

1 Papillon 30G Short (ligne veineuse).

Kétamine-xylazine 1ml/kg.

Méthotrexate 12 mg/kg, i.v.(0.1 ml) chaque souris.

Doxorubicine 10 mg/kg i.v. (0.1ml) chaque souris.

Doxorubicine 5 mg/kg jour 0 et jour 7 (0.1 ml) chaque souris.

Létrozole 5 mg/kg/jour oral (0.1ml) chaque souris.

¹⁸F-FDG.

PROCÉDURE :

[Hrs -0 :20] Préparation

- Identifier, peser la souris.
- Endormir la souris sous K/X.
- Installer une ligne veineuse 30G short sur la veine caudale.
- Prélever 0.2- 0.4 ml (400 - 500 µCi) de ¹⁸FDG.

[Hrs 0 :00]

- Injection de ¹⁸FDG
- Mesurer et noter la dose ____Heure ____ avant et après de l'injection.
- Mesurer l'activité de la souris.
- Vérifier que l'animal est stable et noter les paramètres vitaux.
- Garder les souris dans leur cage et placer derrière la protection Plombée
- Attendez 1 heure pour mesurer avec le TEP.

[Hrs 1 :00] FDG (mesure de corps entier pendant 20 minutes):

Placer l'animal dans la caméra TEP.

- Positionner l'animal pour que les tumeurs soient dans le champ de la caméra (laser).
- Préparer le programme d'acquisition de volume (3 positions de lit , double échantillonnage axial, sur 20 minutes).

Démarrer l'acquisition et faire un volume de la tumeur pendant 20 min.

Pendant l'acquisition:

Noter les paramètres vitaux.

[Hrs 1 :20] FIN DE LA PROCÉDURE D'IMAGERIE DE CORPS ENTIER AU FDG

Fin de la séance d'imagerie

Retirer l'animal de la caméra et procéder à la phase de réveil.

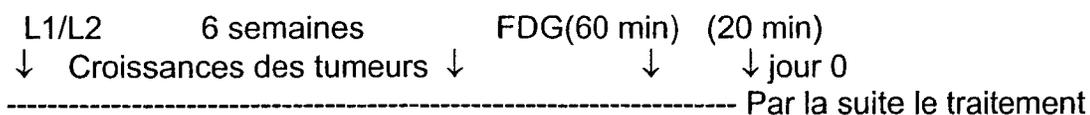
Nettoyer le lit de la caméra.

Regrouper toute l'information dans un même fichier, noter les noms des fichiers, compléter et classer les dossiers.

Un fois que l'acquisition est terminée, injecter doxorubicine et méthotrexate via i.v à chaque souris et le létrozole à chaque jour via gavage.

Répéter la même mesure pour les jours 1, 7 et 14 après le traitement.

TEP/FDG



Intervention thérapeutique	Groupes expérimental	Traitement	Nombre des souris
Contrôles	Contrôles	Non traité	6
Chimiothérapie	Doxorubicine	10 mg/kg jour 0 ^a ; (iv) ^b	6
	Doxorubicine	5 mg/kg jour 0 et jour 7 (iv)	6
	Méthotrexate	12 mg/kg jour 0 (iv)	6
Hormonothérapie	Létrozole	5 mg/kg/chaque/jour 0 (or) ^b	6

^a Images TEP.

^b iv = intraveineuses, or = oral.

VII. RÉFÉRENCES

Anchisi S. et al., « Cancer du sein », *Forum Med Suisse*, n° 42, p.1045-1050 (2001).

Anzick S.L. et al., «AIB1 a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer», *Science*, n° 277, 965-968 (1997).

Arslan N. et al., «Comparison of dual phase Tc99m MIBI and 99mTC MDP scintimammography in the evaluation of breast masses», *Ann Nucl Med*, n° 14, 39-46 (2000).

Baum M. et al., «Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial», *Lancet*, n° 359, 2131-2139 (2002).

Bernstein L. et Ross R. K. «Endogenous hormones and breast cancer risk», *Epidemiol Rev*, vol.15 n° 1, 48-65 (1993).

Berridge M. S. et al., «Cyclic sulfates: Useful substrates for selective nucleophilic substitution», *J Org Chem*, n° 55, 1211-1217 (1994).

Bertino J.R. et al., «Resistance mechanisms to methotrexate in tumors», *Stem Cells*, n° 14, 5-9 (1996).

Bradlow H.L. et al., «16 alpha-hydroxylation of estradiol: a possible risk marker for breast cancer», *Ann NY Acad Sci*, n° 464, 138-151 (1986).

Bradlow H.L. et D.L. Davis, «Effects of pesticides on the ratio of 16alpha-2hydroxyestrone: a biological marker of breast cancer risk», *Env Health Perspec*, n° 103, 147-150 (1995).

Bradlow H.L. et al., «Estradiol 16alpha hydroxylation in the mouse correlates with mammary tumor incidence and presence of murine mammary tumor virus: a possible model for the hormonal etiology of breast cancer in humans», *Proc Natl Acad Sci USA*, n° 82, 6295-9 (1985).

Brodie A., Jelovac D. et B.J. Long, «Predictions from a preclinical model: studies of aromatase inhibitors and antiestrogens», *Clin Cancer Res*, n° 9, 455S-9S (2003).

Brody L.C. et B.B. Briesecker, «Breast cancer susceptibility genes, BRCA1 And BRCA2», *Médecine*, n° 77, 208-226 (1998).

Buzdar A.U., «Endocrine therapy in the treatment of metastatic breast cancer», *Semin Oncol*, n° 28, 291-304 (2001).

Buzdar A.U. et al., «An overview of the pharmacology and pharmacokinetics of the newer generation aromatase inhibitors anastrozole, letrozole, and exemestane», *Cancer*, n° 95, 2006-16 (2002).

Cauley J.A. et al., «Continued breast cancer risk reduction in postmenopausal women treated with raloxifene: 4-year results from the MORE trial», *Breast Cancer Res Treat*, n° 65, 125-134 (2001).

Cavalieri E.K. et al., «Estrogens as endogenous genotoxic agents DNA adducts and mutations», *J Natl Cancer Inst Monogr*, n° 27, 75-93 (2000).

Cavalieri E.L. et E. G. Rogan, «A unified mechanism in the initiation of cancer», *Ann N Y Acad Sci*, n° 959, 341-354 (2002).

Chlebowski R. et al., «American society of clinical oncology technology assessment on breast cancer risk reduction strategies : tamoxifen and raloxifene», *J Clin Oncol*, n° 17,1939-1955 (1999).

Cimitan M. et al., «The use of thallium-201 in the preoperative detection of breast cancer: An adjunct to mammography and ultrasonography», *Eur J Nucl Med*, n° 22, 1110-1117 (1995).

Clarke R. et al., «Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance», *Pharmacol Rev*, n° 53, 25-71 (2001).

Clemett, D, et H.M. Lamb, «Exemestane : A review of its use in postmenopausal women with advanced breast cancer», *Drug*, vol. 59, n° 6, 1279-96 (2000).

Clemons M. et P. Goss, « Estrogen and the risk of breast cancer », *N Engl J Med*, vol. 344, n° 4 (25 juin 2001).

Collier T.L. et al., «Assessment of cancer-associated biomarkers by positron emission tomography: Advances and challenges», *Disease Markers*, n° 18, 211-247 (2002).

Coumoul X. et R. Barouki, «Génotoxicité des métabolites des œstrogènes et cancer», *Medecine et sciences*, n° 18, 86-90 (2002).

Cummings S.R. et al., «The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women», *JAMA*, n° 281, 2189-2197 (1999).

Czernin J., «FDG-PET in Breast Cancer: A Different View of its Clinical Usefulness», *Mol Imaging Biol*, Vol. 4 n° 1, 35-45 (2002).

Dehdashti F. et al., «Positron tomographic assessment of estrogen receptors in breast cancer comparison with FDG-PET and in vitro receptor assays», *J Nucl Med*, n° 36, 1766-1774 (1995).

Dehdasti F. et al., «Positron emission tomographic assessment of “metabolic flare” to predict response of metastatic breast cancer to antiestrogen therapy», *Eur J Nucl Med*, n° 26, 750-761 (1999).

Delbeke D. et W.H. Martin, «Positron Emission Tomography Imaging in Oncology», *Rad Clin Nort America*, Vol. 39, n° 5, 883-917 (2001).

Dipiro J.T., et al., «Pharmacotherapy; Apathologic Approach», 267-268 (1999).

Dutertre M. et C.L. Smith, «Molecular mechanisms of selective estrogen receptor modulator (SERM) action», *J Pharmacol Exp Ther*, n° 295, 431-7 (2000).

Easton D.F. et al., « Genetic linkage in familial breast and ovarian cancer : Results from 214 families », *Am J Hum Genet*, n° 52, p. 678-701 (1993).

Ettinger B. et al., «Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomised clinical trial», *JAMA*, n° 282, 637-45 (1999).

Farber S., L. Diamond et R. Mercer, «Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid (aminopterin) », *N Engl J Med*, n° 238, 787-793(1948).

Fleming, G.F. et R.L Schilsky, «Antifolates: The next generation», *Sem Oncol*, n° 19, 709-719 (1992).

Goldenberg, D.M. et H.A. Nabi, «Breast cancer imaging with radiolabeled antibodies», *Sem Nucl Med*, n° 29, 49-56 (1999).

Gopalan D., Bomanji J.B., Costa D.C.et Ell P.J., «Nuclear medicine in primary breast cancer imaging», *Clin Radiology*, n° 57, 565-574 (2002).

Goss P.E. et al., «A Randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer», *N Engl J Med*, n° 349, 1793-1802 (2003).

Green. S. et al., «Cloning of the human estrogen receptor cDNA», *J Steroid Biochem*, vol. 24 n° 1, 77-83 (1986a).

Greenspan F. S. et J. D., « Basic and Clinical Endocrinology», P.453-472 (1994).

Guo, P. et al., «Overexpression of vascular endothelial growth factor by MCF-7 breast cancer cells promotes estrogen-independent tumor growth in vivo», *Cancer Res*, n° 63, 4684-91(2003).

Henderson, B.E. et H.S. Feigelson, «Hormonal carcinogenesis», *Carcinogenesis*, n° 21, 427-433 (2000).

Hryb D.J., Khan M.S., Romas N.A.et W. Rosner, «The control of the interaction of sex hormone-binding globulin with its receptor by steroid hormones», *J Biol Chem*, n° 265, 6048-6054 (1990).

Jansen G. et al., «A structurally altered human reduced folate carrier with increased folic acid transport mediates a novel mechanism of antifolate resistance», *J Biol Chem*, n° 273, 2526-2531 (1998).

Keyes J.W., «SUV:Standard uptake or silly useless value?», *J Nucl Med*, n° 36, 1836-1839 (1995).

Jordan, V.C., Gottardis, M.M., Robinson, S. P., et Friedl A., «Immune-deficient animals to study "hormone-dependent" breast and endometrial cancer», *J Steroid Biochem*, n° 34,169-76 (1989).

Kerlikoske, et al., «Efficacy of screening mammography», *JAMA*, n° 273, 149-54 (1995).

Key T.J. et al., «Sex hormones in women in rural China in Britain», *Br J Cancer*, vol. 62 n° 4, 631-636 (1990).

Kieswetter D. et al., «Preparation of four fluorine-18-labeled estrogens and their selective uptake in target tissues of immature rats», *J Nucl Med*, n° 25, 1212-1221 (1984).

Kuiper, G.G. et al., «Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary», *Proc Natl Acad Sci USA*, n° 93, 5925-5930 (1996).

Lecomte R., et al., «Design and engineering aspects of a high resolution positron tomograph for small animal imaging», *IEEE Trans Nucl Sci*, vol. 41, 1446-1452 (1994).

Lecomte R., et al., «Initial results from the Sherbrooke avalanche photodiode positron tomograph», *IEEE Trans Nucl Sci*, vol. 43, n° 3, 1952-1957 (1996).

Lee J. R., «Tout savoir sur la préménopause», *Éditions Sully*, c, 3, P-49 (2001).

Levine, M. et al. «La chimioprévention du cancer du sein», *JAMC*, vol. 164 n° 12, 1681-1690 (2001).

Liehr J.G. et al., «Localisation of estrogen-induced DNA adducts and cytochrome P-450 activity at the site of renal carcinogenesis in the hamster kidney», *Cancer Res*, n° 41, 2156-2159 (1987).

Lupulescu A., «Estrogen use and cancer incidence: a review», *Cancer Invest*, n° 13, 287-295 (1995).

McDonnell D.P., «Definition of the molecular mechanism of action of tissue-selective oestrogen-receptor modulators», *Biochem Soc Trans*, n°26, 54-60 (1997).

McDonnell D.P. et al., «Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens», *Mol Endocrinol*, n° 9, 659-669 (1995).

McElvany K.D. et al., «Factors affecting the target site uptake selectivity of estrogen radiopharmaceuticals: serum binding and endogenous estrogens», *J Steroid Biochem*, n° 18, 635-641 (1983).

McGuire A.H. et al., Positron tomographic assessment of 16 alpha-(18F) fluoro-17 beta-estradiol uptake in metastatic breast carcinoma», *J Nucl. Med*, n° 32, 1526-31 (1991).

McKenzie K. et S. Sukumar, «Molecular genetics of human breast cancer», *Prog Clin Biol Res*, 394, 183-209 (1996).

Mintun M.A. et al., «Breast cancer: PET imaging of estrogens receptors», *Radiology*, 167, 45-48 (1988).

Mora, S. et al., «Coronary artery disease in postmenopausal women», *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, n° 2, 345-352 (2001).

Mortimer J.E. et al., «Clinical correlation of FDG and FES-PET imaging with estrogen receptors in breast cancer and response to systemic therapy», *Clin Cancer Res*, n° 2, 933-939 (1996).

Mosselman S., Polman J. et Dijkema R., «ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor FEBS», *Letters*, n° 392, 49-53 (1996).

Muller S.T. Guth-Tougelids B. et Creutzig G.H., «Imaging of tumors with 99mTC MIBI SPECT», *Eur J Nucl Med Med*, n° 28, 562 (1987).

Murphy L.C. et al., «Altered expression of estrogen receptor coregulators during human breast tumorigenesis», *Cancer Res*, n° 60, 6266-6271 (2000).

Osborne C.K., «Mechanisms for tamoxifen resistance in breast cancer: possible role of tamoxifen metabolism», *J Steroid Biochem & Mol Biol*, n° 47, 83-9 (1993).

Osborne C.K., Hobbs K. et Clark G. M., «Effect of estrogens and antiestrogens on growth of human breast cancer cells in athymic nude mice», *Cancer Res*, n° 45, 584-90 (1985).

Osborne C.K., Hobbs K. et J.M.Trent, «Biological Differences Among MCF-7 Human Breast Cancer Cell Lines From Different Laboratories», *Br Cancer Res Treat*, n° 9, 111-21 (1987).

Paech K. et al., «Differential ligand activation of estrogen receptor ER α and ER β AP1 sites», *Science*, n° 277, 1222-1224 (1997).

Pan C.C., Woolever C. A. et B. R. Bhavnani, «Transport of equine estrogens: binding of conjugated and unconjugated equine estrogens with human serum proteins», *J Clin Endocrinol Metab*, n° 61, 499-507 (1985).

Pettersson K. et F. Gustafsson, «Role of estrogen receptor beta in estrogen action», *Ann Rev Physiol*, 63, 165-92 (2001).

Phelps M.E., «Inaugural article: Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes», *Proc Natl Acad Sci USA*, n° 97, 9226-9233 (2000).

Phillips A., Chalbos D. et H. Rochefort, «Estradiol increases and antiestrogens antagonize the growth factor-induced activator protein-1 activity in MCF-7 breast cancer cells, without affecting c-fos and c-jun synthesis», *J Biol Chem*, n° 268, 14103-14108 (1993).

Piccolo S. et al., «Technetium-99m-methylene diphosphonate scintimammography to image primary breast cancer», *J Nucl Med*, n° 36, 718-724 (1995).

Rigo P. et al., «Oncological applications of positron emission tomography with fluorine-18 fluorodeoxyglucose» *Eur J Nucl Med*, n° 23, 1641-1674 (1996).

Roger P. et al., «Decreased expression of estrogen receptor β protein in proliferative preinvasive mammary tumors», *Cancer Res*, n° 61, 2537-2541 (2001).

Santé Canada, www.hc-sc.gc.ca/francais/vsv/maladies/cancer_sein.html

Santen R.J. et H. A. Harvey, «Use of aromatase inhibitors in breast carcinoma», *End Related Cancer*, n° 6, 75-92 (1999).

Schiff R., Massarweh S., Shou J. et C.K. Osborne, «Breast cancer endocrine resistance: how growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response», *Clin Cancer Res*, n° 9, 447s-454s (2003).

Scott L.J. et L.R. Wiseman, «Exémestane», *Drug*, 58(4), 675-80 (1999).

Sheidhauer K. et al., «Quantitative (18F) FDG positron emission tomography in primary breast cancer: clinical relevance and practicability», *Eur J Nucl Med*, n° 23, 618-623 (1996).

Société canadienne du cancer, www.cancer.ca/.

Stalford A.C. et al., «The metabolism of 16-fluoroestradiols in vivo: chemical strategies for restricting the oxidative biotransformations of an estrogen-receptor imaging agent», *Steroids*, n° 62, 750-761 (1997).

Strel'chyonock, O.A. et G.V. Avvakumov, «Specific steroid-binding glycoproteins of human blood plasma: novel data on their structure and function», *J Steroid Biochem*, n° 35, 519-534 (1990).

Swaneck, G.E. et J. Fishman, «Covalent binding of the endogeneous estrogen 16 α -hydroxyestrone to estradiol receptor in human breast cancer cells: characterization and intranuclear localization», *Proc Natl Acad Sci USA*, n° 85, 7831-7835 (1988).

Taillefer R., «The role of ⁹⁹Tc-sestamibi and other conventional radiopharmaceuticals in breast cancer diagnosis», *Rev Nucl Med*, n° 29, 16-40 (1999).

Tewson T.J. et K.A. Krohn, «PET radiopharmaceuticals: State-of-the-art and future prospects». *Sem Nuc Med*, n° 28, 221-234 (1998).

Turner, R.T., B.L. Riggs et T.C. Spelsberg, «Skeletal effects of estrogen», *Endocrine Rev*, n°15, 275-300 (1994).

Veronesi U. et al., «Prevention of breast cancer with tamoxifen :preliminary findings from the Italian randomised trial among hysterectomised women», *Lancet*, n° 352, 9397 (1998).

Vesselle H. et al., «Lung cancer proliferation correlates with (F-18)Fluorodeoxyglucose uptake by positron emission tomography», *Clin Cancer Res*, n° 6, 3837-3844 (2000).

Vogel V.G., «Reducing the risk of breast cancer with tamoxifen in women at increased risk», *J Clin Oncol*, n° 19, 87S-92S (2001).

Wu A. M. et al., «High-resolution microPET imaging of carcinoembryonic antigen-positive xenografts by using a copper-64-labeled engineered antibody fragment», *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 8495-8500 (2000).