

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE PHARMACIE SPECIALISEE

Soutenu devant le Jury interrégional
Le 09 Mai 2007

Par M. **Mickaël BOURGEOIS**

Conformément aux dispositions de l'arrêté
Du 06 mai 1987 tient lieu de

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Immunovectorisation de radioéléments
émetteurs de particules alpha ;
une nouvelle voie thérapeutique en cancérologie**

Président : M. Alain TRUCHAUD, Professeur – UFR Pharmacie (Nantes)
Membres du jury : M. Alain FAIVRE-CHAUVET, Professeur – UFR Pharmacie (Nantes)
M. Michel CHEREL, Maître de Conférence – UFR Médecine (Nantes)
M. Jean-Claude MAUPETIT, Pharmacien – CHU de Nantes
M. Jacques BARBET, Directeur de recherche - INSERM U 601 (Nantes)
M. François HINDRE, Maître de Conférence – UFR Médecine (Angers)

TABLES DES MATIÈRES

TABLES DES MATIÈRES.....	2
Liste des Abréviations et Symboles	4
Préambule.....	1
Premiere Partie : Propriétés des Anticorps Production et Utilisation Clinique des Anticorps Monoclonaux	2
I. Les Anticorps.....	2
A. Historique	2
B. Déroulement de la réponse immunitaire	3
C. Propriétés des anticorps	6
1. Généralités.....	6
2. Structure générale des Anticorps.....	6
3. Niveau de diversité des anticorps	9
4. structure des anticorps et lyse enzymatique	10
5. Complexe Antigène-Anticorps.....	11
II. Les Anticorps Monoclonaux	13
A. Origine et production des anticorps monoclonaux	13
1. Production d'hybridomes spécifiques.....	13
2. Sélection d'hybridomes spécifiques d'un antigène	15
3. Production des anticorps monoclonaux	16
B. Production d'anticorps monoclonaux d'origine humaine	16
1. Anticorps monoclonaux chimériques ou humanisés	17
2. Techniques en cours de développement	17
C. Classification	19
D. Indications thérapeutiques	20
Deuxieme Partie : Vecteurs Immunologiques Radiomarqués.....	22
I. Principes Methodologiques	23
A. Introduction.....	23
B. Effets biologiques des rayonnements ionisants	23
1. Effets Cellulaires	23
2. Effets tissulaires	26
3. Notion de dosimétrie	27
C. Immunovectorisation en Oncologie	28
1. Rappels.....	28
2. L'antigène tumoral.....	28
3. La tumeur	28
4. L'ImmunoVecteur	29
5. Le radionucléide.....	31
6. Couplage radionucléide-vecteur	33
II. Indications Cliniques des Immunovecteurs	36
A. Indications diagnostiques	36
B. Indications thérapeutiques	36
III. Optimisation de la RIT.....	38
A. Amélioration de l'activité spécifique	38
B. Stratégie multi-temps	39
1. Stratégie avidine-biotine en trois temps	39
2. Stratégie « Affinity Enhancement System » en deux temps	40
C. Amélioration du transfert d'énergie linéique (TEL).....	41
Troisieme Partie : Radio-Immunothérapie Alpha	43
I. Objectif du travail Expérimental.....	44
II. Isotopes d'Intérêt.....	44
A. Moyens de production des isotopes d'intérêt	46
1. Radium-223.....	46
2. Actinium-225 et Bismuth-213	46
3. Bismuth-212 et Plomb-212.....	46
4. Astate-211	46
B. Radiochimie.....	48

1. Bismuth	48
2. Plomb	48
3. Astate	49
II. Essai de Marquage	50
A. Matériels et méthodes	50
1. Matières premières	50
2. Modification des anticorps.....	50
3. Radiomarquage de vecteurs au bismuth-213, bismuth-212 et plomb-212.	51
4. Radiomarquage d'un vecteur (BSA) à l'astate-211	52
B. Résultats	54
1. Couplages des vecteurs aux complexants de types p-SCN Bn-DOTA et CHX-A"-DTPA.	54
2. Marquage d'anticorps au Bismuth-213.	55
3. Marquage au bismuth-212	56
4. Marquage au plomb-212	57
5. Marquage à l'astate-211	58
C. Discussion.....	61
1. Bismuth – 213	61
2. Bismuth-212 et Plomb-212.....	62
3. Astate-211	62
CONCLUSION	63
Annexes	64
Bibliographie.....	73

LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

ACE : Antigène Carcino-Embryonnaire
ADCC : Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity
AES : Affinity Enhancement System
AS : Activité Spécifique
CD : Cluster de Différenciation
CDR : Complementarity Determining Region
CH : Constant Heavy
CL : Constant Light
Da : Dalton
EBR : Effet Biologique Relatif
EGFR : Epidermic Growth Factor Receptor
FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography
HACA : Human Anti-Chimeric Antibody
HAHA : Human Anti-Human Antibody
HAMA : Human Anti-Mouse Antibody
HAT : Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine
HGPRT : Hypoxanthine Guanine PhosphoRibosyl Transferase
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
ITLC-SG : Instant Thin Layer Chromatography – Silica Gel
MeV : Mega électron-volts
RIT : Radio-Immunotherapie
SPECT : Single Photon Emission Computed Tomography
TEL : Transfert d'Energie Linéique
TEP : Tomographie par Emission de Positons
TNF : Tumor Necrosis Factor
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VH : Variable Heavy
VL : Variable Light

PREAMBULE

L'idée d'utiliser la radioactivité en médecine prend corps en novembre 1936 à la suite d'une demande d'endocrinologues du Massachusetts General Hospital (Boston, USA) qui ne disposaient pas de moyens d'investigation directs de la fonction thyroïdienne. Dès 1937, les physiciens nucléaires produiront des isotopes radioactifs de l'iode, élément présentant de façon intrinsèque un fort tropisme pour la thyroïde. Le but premier de cette collaboration entre physiciens et médecins fut le traitement de la maladie hyperthyroïdienne et du cancer thyroïdien. Ainsi, la première dose thérapeutique d'iode radioactif (iode-130) fut injectée en janvier 1941 dans un cas de maladie de Basedow. Grâce à des caractéristiques physiques plus appropriées, l'iode-131 (disponible depuis août 1946) va rapidement devenir le principal radionucléide qui entraînera l'essor des explorations radioisotopiques donnant ainsi naissance à la spécialité de médecine nucléaire [1].

La médecine nucléaire est la spécialité médicale qui utilise des radioisotopes à des fins diagnostiques ou thérapeutiques. L'imagerie isotopique présente la particularité d'être une imagerie fonctionnelle permettant d'étudier, via la localisation d'un signal émis par un radiopharmaceutique, les anomalies touchant le métabolisme de ce radiotracer. Les différents isotopes utilisés dans un but diagnostique sont des émetteurs de photons gamma (comme le technétium-99m ou l'indium-111) ou des émetteurs de particules β^+ (comme le fluor-18). L'investigation clinique par l'imagerie représente la grande majorité des examens réalisés en routine dans un service de médecine nucléaire. Depuis quelques années, la médecine nucléaire a vu le nombre de ses indications thérapeutiques augmentées en ayant recours à la vectorisation de radionucléides émetteurs de particules β^- (comme l'iode-131 ou l'yttrium-90) qui ont pour caractéristique de déposer une forte énergie à proximité de leur lieu d'émission et ainsi de détruire les tissus environnants. L'utilisation de ce type d'isotope est limitée à l'emploi de vecteur spécifique du tissu à détruire afin de minimiser l'irradiation aux tissus sains.

Si le tropisme intrinsèque de l'iode pour la thyroïde permet un bon rapport entre l'irradiation de l'organe pathologique et les tissus sains, la médecine nucléaire a dû développer des vecteurs spécifiques pour des indications anti-tumorales ou palliatives que ce soit avec de l'iode-131 ou avec d'autres radionucléides. Le défi de la radiopharmacie fut de produire un vecteur dont la pharmacocinétique soit compatible avec la demi-vie du radionucléide, qui soit à la fois spécifique de l'organe à traiter et suffisamment stable in vivo pour ne pas induire d'effets radiotoxicologiques sur les tissus sains. Utilisés en clinique depuis une vingtaine d'année, les anticorps monoclonaux sont apparus comme un vecteur de choix en médecine nucléaire dans le traitement de pathologies cancéreuses.

La première partie de ce mémoire présente les différentes formes et propriétés des anticorps utilisés en clinique ainsi que les différents moyens de les obtenir. Elle a pour dessein de resituer cette classe pharmacologique qui a démontré une réelle efficacité clinique dans de nombreuses pathologies requérant l'intervention du système immunitaire (chimiothérapie anti-cancéreuse, maladie auto-immune, rejets d'allogreffe, etc...).

Une seconde partie bibliographique de ce mémoire décrit les différentes techniques utilisées pour modifier des anticorps afin qu'ils puissent être radiomarqués. Cette partie aborde également les différentes voies qui ont été utilisées à ce jour afin d'optimiser l'immunociblage des radionucléides. Enfin, les différentes utilisations en médecine nucléaire sont décrites, que ce soit dans un but diagnostique (immunoscintigraphie) ou à dessein thérapeutique (radio-immunothérapie).

La troisième partie de ce mémoire est consacrée à une étude expérimentale menée au sein de l'unité INSERM U601 de Nantes. Elle a pour but d'étudier la faisabilité de couplage de protéines de type anticorps avec des radioisotopes émetteurs de particules alpha. En effet, si la radio-immunothérapie (RIT) a démontré une réelle efficacité avec des isotopes émetteurs de particules β^- , la faisabilité d'une radio-immunothérapie avec des émetteurs de particules alpha semble une alternative permettant une optimisation de la dose délivrée à la tumeur.

PREMIERE PARTIE : PROPRIETES DES ANTICORPS PRODUCTION ET UTILISATION CLINIQUE DES ANTICORPS MONOCLONAUX

I. LES ANTICORPS

A. HISTORIQUE

La notion d'anticorps est apparue avec l'essor de la biologie à la fin du XIX^e siècle. Emil Behring (prix Nobel de physiologie et de médecine en 1901) ouvre la voie de la sérothérapie en 1890 après avoir mis en évidence dans le sérum d'animaux vaccinés la présence d'anti-toxine diphtérique. Avec sa théorie de la chaîne latérale (1897), Paul Ehrlich (prix Nobel de physiologie et de médecine en 1908) conçoit que la spécificité de l'anticorps pour l'antigène est absolue, qu'il existe autant d'anticorps différents que d'antigènes et que l'interaction antigène-anticorps provoque une liaison stable. En 1917, Karl Landsteiner contribue à expliquer la spécificité immunologique des anticorps à l'aide de déterminants antigéniques simples : les haptènes. Il démontrera, par exemple, qu'une molécule simple de type azobenzate est reconnue par des anticorps différents selon que la substitution azotée est effectuée en position ortho, méta ou para. Il étudiera également le phénomène de réaction croisée réfutant ainsi le concept de spécificité absolue défendu par Ehrlich. C'est ainsi qu'émerge l'idée qu'un antigène n'est pas une entité unique mais une mosaïque de structures (déterminants antigéniques ou épitopes). Si le concept de spécificité est fermement établi au début des années 1940, on ne connaît que très peu de choses sur son support moléculaire, hormis le fait que les anticorps sont des protéines de nature globulinique et que le site anticorps reconnaît la conformation spatiale de l'antigène selon l'image de la clé s'insérant dans une serrure.

C'est grâce aux progrès technologiques d'après guerre que Arne Tiselius (prix Nobel de chimie en 1948) mis en place la technique d'électrophorèse des protéines plasmatiques et classa les anticorps dans les gamma-globulines (migration la plus lente). L'origine des anticorps dans le sérum humain fut mise en évidence en 1948 par Astrid Fagraeus au niveau de cellules

lymphocytaires B activées lors de la réponse immunitaire : les plasmocytes. Ce n'est qu'avec les travaux de Rodney Porter et de Gerald Edelman (prix Nobel de physiologie et de médecine en 1972) que la structure biochimique des anticorps fut élucidée grâce à la digestion enzymatique par action de la pepsine ou de la papaine. L'origine génétique combinatoire de la diversité des anticorps fut découverte par William Dryer et Claude Bennett en 1965 ainsi que par Susumo Tonegawa en 1976 (prix Nobel de physiologie et de médecine en 1987).

La découverte en 1979 d'un mode de production d'anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre un seul antigène par Niels Jerne, Georges Köhler et César Milstein (prix Nobel de physiologie et de médecine en 1984) a permis d'affiner la connaissance du fonctionnement du système immunitaire. Cette découverte a permis de produire des quantités suffisamment importantes d'anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre un antigène déterminé pour une utilisation en diagnostic (immunodosage par exemple) mais aussi dans la thérapeutique du rejet de greffe, du traitement de maladies auto-immunes ou bien en oncologie dans certains types de cancers [2].

B. DEROULEMENT DE LA REPONSE IMMUNITAIRE

Un organisme pluricellulaire est capable, grâce à un ensemble de mécanismes biologiques nommés « immunité », de maintenir son intégrité en éliminant les substances étrangères et les agents pathogènes. La base de cette immunité est assurée par des cellules issues de la moelle osseuse hématopoïétique : les leucocytes. L'ensemble des organes et des cellules mis en jeu lors de cette immunité font partie du système immunitaire qui assure les trois fonctions physiologiques suivantes : surveillance, identification du « soi » et du « non-soi », ainsi que l'élimination ou la neutralisation des substances reconnues étrangères.

Lorsque le système immunitaire est activé au sein d'un organisme, il est primordial qu'il puisse reconnaître avec efficacité les molécules qui le constituent de celles qui lui sont étrangères. Le principe de la reconnaissance s'effectue par le biais de molécules qui s'expriment sur les membranes cellulaires et qui constituent les marqueurs de l'identité biologique de l'individu (cas du complexe majeur d'histocompatibilité). On définit ainsi le « soi » comme étant l'ensemble des organes, tissus, cellules et molécules issu de la programmation génétique de la cellule œuf. Le « non-soi » est quant à lui défini par l'ensemble des molécules étrangères à l'organisme, c'est-à-dire non codées par son génome. Il est à noter qu'une cellule cancéreuse exprime des molécules modifiées du « soi » et n'est donc par conséquent que faiblement reconnue par le système immunitaire de l'individu. Le système immunitaire développe contre le « non-soi » des réactions ayant pour conséquence sa neutralisation ou sa destruction.

Les macromolécules naturelles ou synthétiques reconnues comme étrangères sont généralement des protéines ou des polysaccharides, elles sont susceptibles d'engendrer une réponse immunitaire et sont dénommées antigènes. Lorsque les barrières de l'organisme (peau et muqueuses) sont franchies par un agent reconnu comme faisant partie du « non-soi », on observe dans un premier temps le développement d'une réaction immunitaire, non spécifique de l'antigène en cause, dite « innée ». Au cours de cette première phase de la réponse immunitaire, l'activation des molécules du complément permet le développement d'un syndrome inflammatoire aboutissant à l'afflux de leucocytes (granulocytes neutrophiles, monocytes et macrophages) dont le rôle est de phagocyter l'agent reconnu comme étranger. Après cette étape de phagocytose, le leucocyte présentera les fragments de molécules de l'agent étranger lysé (« non-soi ») couplés à des molécules du « soi » sur la face extérieure de sa membrane (Figure 1).

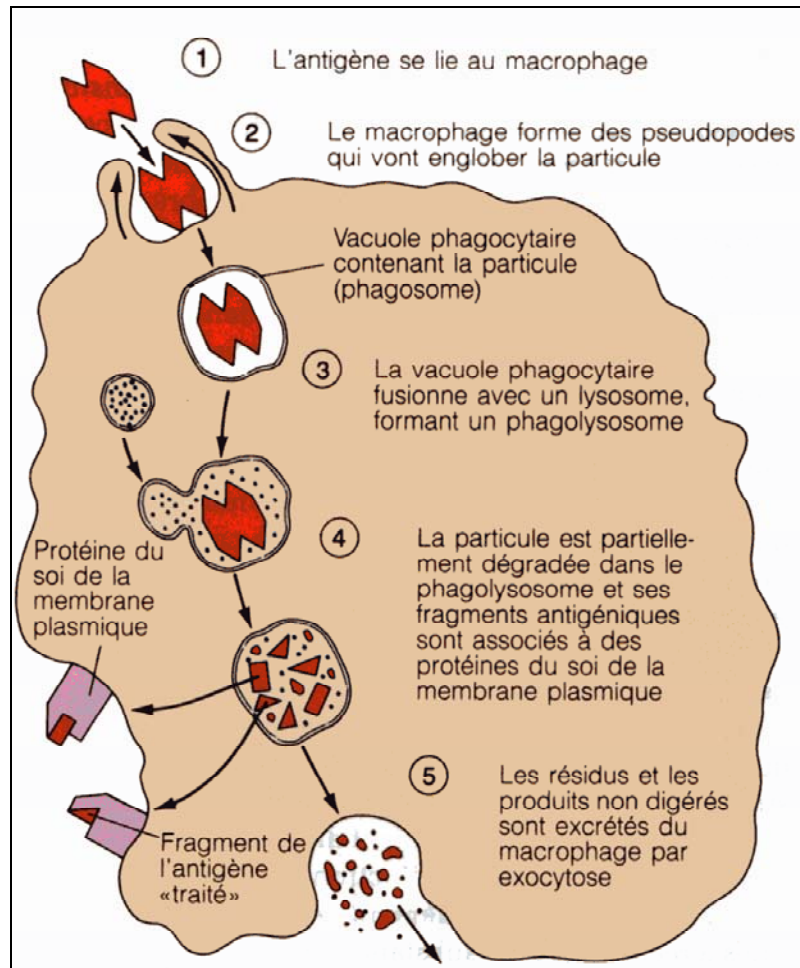


Figure 1 : Rôle du macrophage dans l'immunité non spécifique : phagocytose (assimilation de l'antigène), transformation et présentation de l'antigène au niveau de la membrane cellulaire [3].

Cette présentation de l'antigène par le macrophage permet le recrutement de lymphocytes spécifiques. Cette seconde phase de la réponse immunitaire dépendante de l'antigène est dite « acquise ». La réponse immunitaire spécifique nécessite une coopération entre les cellules immunitaires et comporte trois étapes principales (Figure 2) :

La phase d'induction : la reconnaissance de l'antigène par le lymphocyte a lieu généralement au niveau des organes lymphoïdes périphériques (ganglions lymphatiques, rate...). Cette reconnaissance aboutit à la sélection des clones de lymphocytes possédant les récepteurs membranaires complémentaires aux antigènes présentés.

La phase d'amplification : cette phase qui dure de 5 à 8 jours comporte une première étape de multiplication des lymphocytes activés (étape d'expansion clonale). Et dans un second temps, une étape de différenciation au cours de laquelle certains de ces lymphocytes activés deviennent des cellules effectrices : les lymphocytes T_8 qui évoluent en lymphocytes cytotoxiques, les lymphocytes T_4 qui évoluent en lymphocytes helpers et les lymphocytes B qui évoluent en plasmocytes sécrétant des anticorps circulants.

La phase effectrice qui peut se dérouler selon deux types : la réponse à médiation cellulaire qui a pour support les lymphocytes T cytotoxiques permettant la lyse des cellules cibles, et la réponse à médiation humorale qui a pour support un clone de plasmocytes sécrétant des anticorps circulants spécifiques du déterminant antigénique reconnu comme « non-soi ».

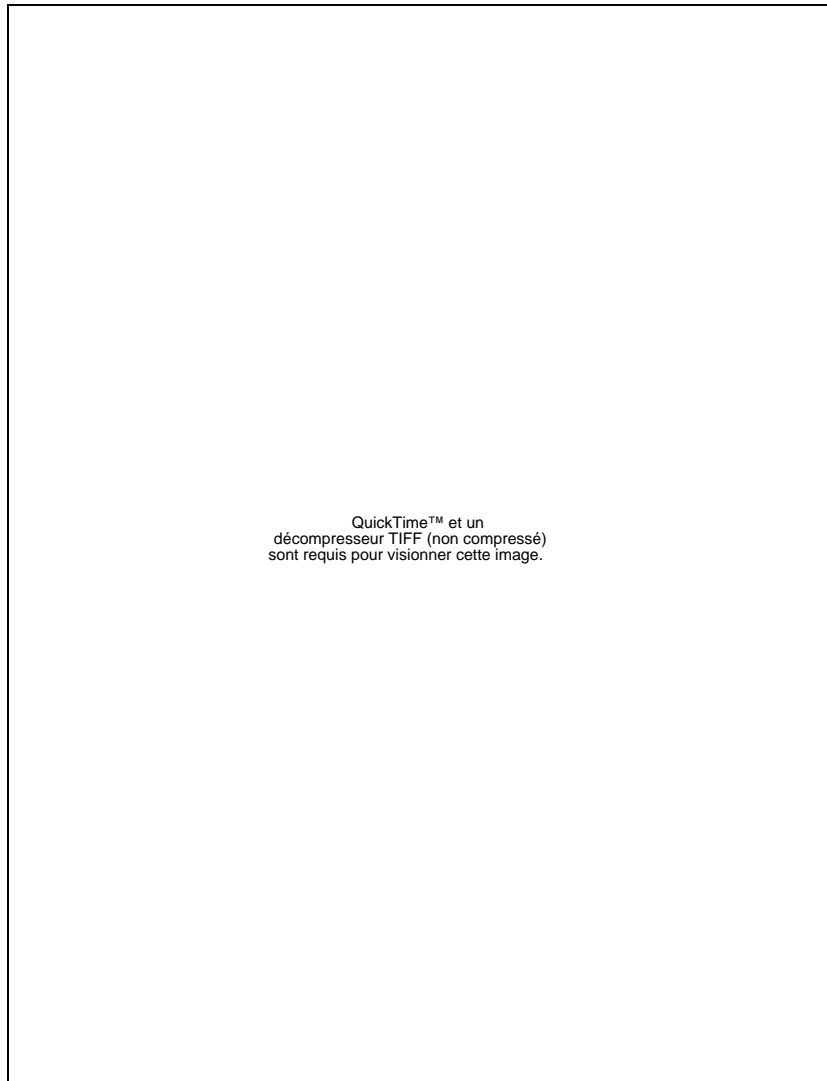


Figure 2 : Déroulement de la réponse immunitaire spécifique dite « acquise » aboutissant, grâce à la coopération des lymphocytes, à la lyse de l'agent étranger.

Lors de la mise en œuvre de la réponse immunitaire, les défenses de l'organisme ont à leur disposition un très grand nombre de lymphocytes B de spécificités différentes, ce qui permet de reconnaître l'ensemble des antigènes existants. Lorsqu'un agent étranger s'introduit dans l'organisme, de très nombreux clones lymphocytaires reconnaissant les différents déterminants antigéniques présents sur les constituants de cet agent étranger, sont activés. Alors que chaque clone est spécifique d'un antigène donné, chaque antigène peut être reconnu par plusieurs clones. Cette multiplicité des clones engagés (polyclonalité) permet une bonne efficacité de la réponse immunitaire en couvrant l'éventail quasi illimité des antigènes pouvant exister.

C. PROPRIETES DES ANTICORPS

1. Généralités

Les anticorps sont des protéines pouvant être glycosylées de la famille des immunoglobulines (Ig) qui sont présentes physiologiquement dans le plasma mais aussi dans les autres liquides biologiques de l'organisme comme les sécrétions. Les immunoglobulines migrent dans la zone γ à l'électrophorèse des protéines plasmatiques (Figure 3). Ce sont, après l'albumine, les protéines les plus représentées au niveau plasmatique. Les immunoglobulines sont synthétisées par les plasmocytes (cellules dérivant des lymphocytes B activés) et sont spécifiques de l'antigène qui a déclenché leur synthèse. Les immunoglobulines représentent les effecteurs de l'immunité humorale.

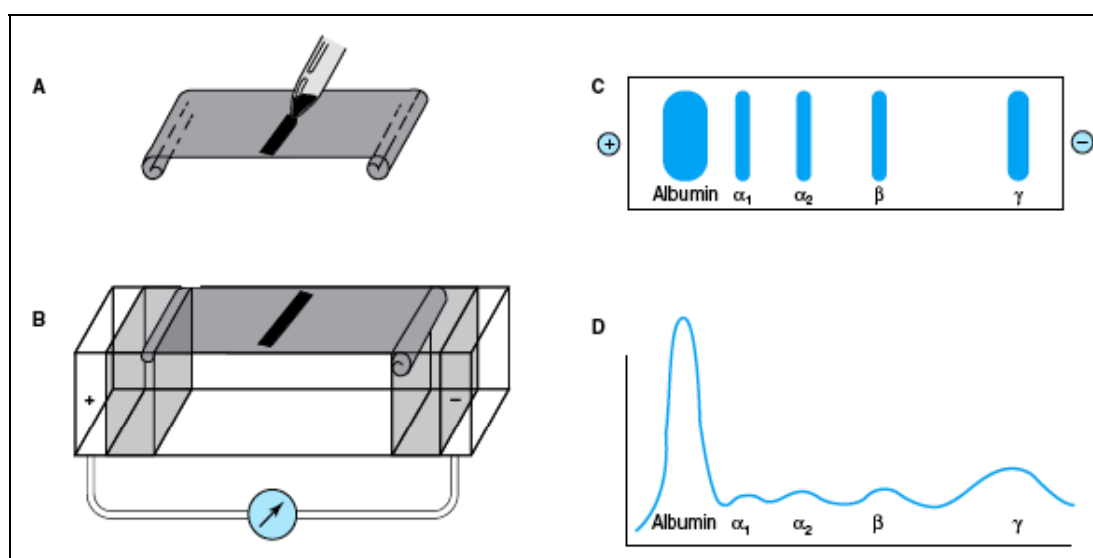


Figure 3 : Electrophorèse des protéines plasmatiques. A) Dépôt de l'échantillon sérique sur un gel d'acétate de cellulose. B) Application d'une différence de potentiel entre les deux extrémités du gel. C) Visualisation sous forme de bandes des différentes protéines constitutives de l'échantillon. D) Mesure UV des différentes bandes (albumine, α_1 -globuline, α_2 -globuline, β -globuline, et γ -globulines) [4].

2. Structure générale des Anticorps

Les anticorps sont des glycoprotéines formées de quatre chaînes polypeptidiques (Figure 4) : deux chaînes lourdes (**H** pour *Heavy*) et deux chaînes légères (**L** pour *light*) qui sont reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures assurant une flexibilité à la molécule. Pour un anticorps donné, les deux chaînes lourdes sont identiques, de même pour les deux chaînes légères (Figure n°5). Le repliement en trois dimensions de ces chaînes forment une structure en Y.

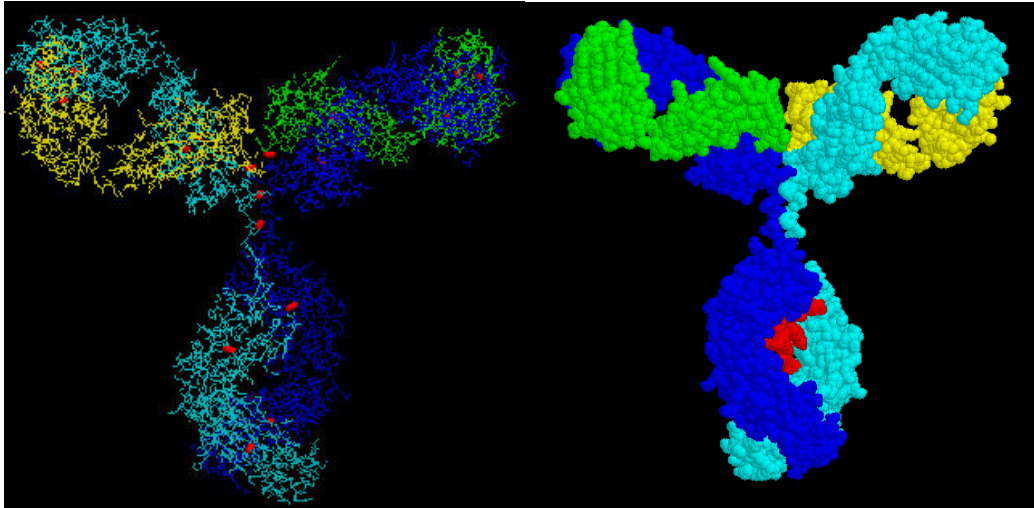


Figure 4 : représentation 3D d'une immunoglobuline. A gauche, représentation en bâtonnets. A droite, représentation en sphère d'une immunoglobuline. Les chaînes lourdes sont colorées en bleu et les chaînes légères en vert et jaune. La coloration rouge est attribuée aux ponts disulfures (à gauche) ou aux chaînes oligosaccharidiques (à droite) [5].

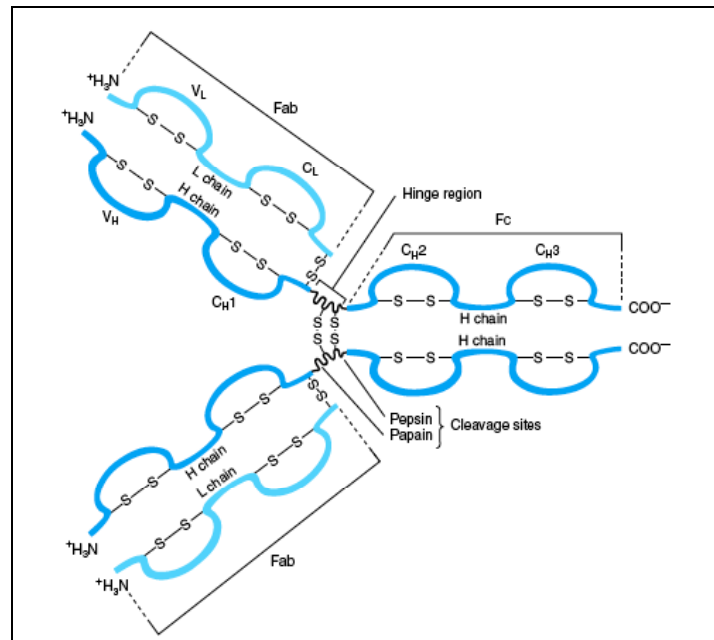


Figure 5 : Représentation schématique d'une immunoglobuline avec ses deux chaînes lourdes (H chain), ses deux chaînes légères (L chain), ses repliements globuliniques et sa région charnière (Hinge region) [4].

Le séquençage protéique des immunoglobulines a été réalisé en 1965 par Putman. Chez l'homme, on retrouve deux types de chaînes légères : les chaînes kappa (κ) et lambda (λ). Un plasmocyte ne peut produire qu'un seul type de chaîne légère, c'est pourquoi, sur une immunoglobuline donnée, les chaînes légères sont identiques (κ ou λ). Au niveau plasmatique, environ 2/3 des immunoglobulines ont des chaînes κ et 1/3 des chaînes λ .

Les chaînes légères sont composées d'environ 220 acides aminés (poids moléculaire : 25 kDa). La partie C-terminale est très conservée au sein des anticorps. La partie N-terminale est quant à elle très variable. Les parties constantes et variables se replient grâce à des ponts disulfures intracaténaux en domaines globulaires d'environ 110 acides aminés caractéristiques de la famille des immunoglobulines (Figure 5).

Les chaînes lourdes varient selon les différentes classes et sous-classes d'immunoglobulines : chaînes lourdes gamma (γ), alpha (α), mu (μ), delta (δ) et epsilon (ϵ) pour les IgG, IgA, IgM, IgD et IgE respectivement. De plus, il existe chez l'homme 4 types de chaînes γ et 2 types de chaînes α définissant les sous-classes suivantes : IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ et IgA₂. Une chaîne lourde est composée d'environ 450 acides aminés (poids moléculaire : 50 kDa). Tout comme les chaînes légères, les chaînes lourdes se replient sur elles-mêmes grâce à des ponts disulfures intracaténaires en domaine globulaire de 110 acides aminés (Figure 5). Les deux chaînes lourdes d'une immunoglobuline sont reliées entre elles à mi-distance des extrémités par une ou plusieurs liaisons covalentes (ponts disulfures). Cette zone dite « charnière » est constituée majoritairement de proline et de cystéine conférant ainsi à la chaîne lourde une grande flexibilité (de 0 à 180 °), facilitant ainsi la liaison de l'immunoglobuline avec son antigène. Selon la classe d'anticorps, on retrouve 3 ou 4 domaines constants notés C_H1, C_H2, C_H3 et C_H4 situés dans la partie C-terminale et un domaine variable V_H situé dans la partie N-terminale. De plus, les chaînes lourdes portent sur leur partie C-terminale des chaînes oligosaccharidiques (glycanes) au nombre de 1 à 7 selon la classe de l'anticorps.

Les domaines constants ne sont pas impliqués dans la reconnaissance de l'antigène, mais interviennent dans l'activation du système du complément et dans la liaison aux cellules immunitaires. Une immunoglobuline possède quatre domaines variables, deux sur les chaînes lourdes et deux sur les chaînes légères. L'association entre un domaine variable porté par une chaîne lourde (V_H) et le domaine variable adjacent porté par une chaîne légère (V_L) constituent le site de reconnaissance (ou paratope) de l'antigène (Figure 6). Ainsi, une molécule d'immunoglobuline possède deux sites de liaison à l'antigène. Ces deux valences sont identiques, d'où la possibilité de lier deux molécules d'antigène par anticorps.

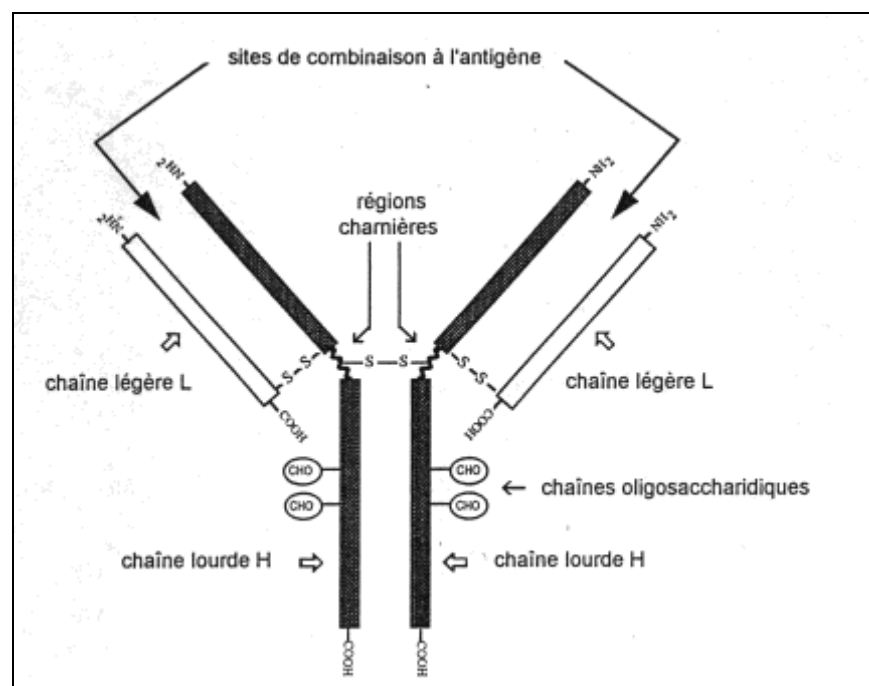


Figure 6 : Représentation schématique d'un anticorps avec sa région charnière, ses chaînes oligosaccharidiques et ses deux sites de liaison à l'antigène.

D'un point de vue tridimensionnel, un domaine variable se replie et expose en périphérie trois zones hypervariables constituées de seulement quelques acides aminés : CDR1, CDR2 et CDR3 (« *complementarity determining regions* »). La liaison antigène-anticorps s'effectue au niveau de ces zones hypervariables. L'antigène est donc reconnu par 6 boucles peptidiques (3 pour la chaîne légère et 3 pour la chaîne lourde).

3. Niveau de diversité des anticorps

a. Isotypie

Dans une espèce animale donnée, les classes et les sous-classes d'immunoglobulines (c'est-à-dire les différents types de chaînes lourdes et légères) possèdent des caractères propres à l'espèce. Ces caractères sont dénommés isotypes. et déclenchent, lorsqu'ils sont injectés à une autre espèce l'apparition d'anticorps anti-isotypes ayant pour but d'éliminer l'isotype reconnu alors comme antigène étranger. Ainsi l'injection d'anticorps murin à un être humain induit la synthèse d'anticorps anti-isotypes de souris : HAMA (« *Human Anti-Mouse Antibodies*») neutralisant l'action de l'anticorps injecté et pouvant entraîner une réaction immunitaire potentiellement létale (choc anaphylactique).

Chez l'homme, on dénombre 5 isotypes différents classés en fonction de la nature des domaines constants de la chaîne lourde : γ , α , μ , δ ou ϵ (Tableau 1).

Tableau 1 : Propriétés des différents isotypes d'immunoglobulines.

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Type de chaîne lourde	γ	α	μ	δ	ϵ
Type de chaîne légère	κ ou λ	κ ou λ	κ ou λ	κ ou λ	κ ou λ
Localisation	Sang	Muqueuse, sécrétion	Lymphocyte B, sang	Lymphocyte B	Basophiles, mastophiles
Concentration plasmatique	8 – 18 g/L	0,9 – 4,5 g/L	0,75 – 2,6 g/L	0,03 – 0,35 g/L	< 0,1 g/L
Proportion	70-75 %	15-20 % des Ac sériques	10 %	< 1 %	< 1 %
Demi-vie plasmatique	3 semaines	6 jours	5 jours	4 jours	2 à 3 jours
Forme sérique	Monomère	Dimère	Pentamère	Monomère	Monomère
Poids moléculaire	146 kDa	385 kDa	970 kDa	185 kDa	190 kDa
Nb de déterminants antigéniques	2	2 à 4	2 à 10	2	2
Rôle	Neutralisation des toxines, bactéries et virus	Agglutination, neutralisation des bactéries, virus	Agglutination, voie classique du complément	Allergies, neutralisation de parasites	Activation du lymphocyte B

b. Allotypie

Les allotypes correspondent à des variations génétiques entre individus, au sein d'une même espèce. Chez l'homme, toutes les différences allotypiques sont situées sur les domaines constants des chaînes lourdes et des chaînes légères.

Les allotypes des immunoglobulines ont été découverts en 1956 par Grubb et Laurell sur les chaînes lourdes d'isotypes de type IgG. Au total, on dénombre vingt quatre allotypes différents pour les chaînes IgG regroupés au sein des quatre sous-classes : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4.

Les chaînes lourdes des IgA présentent quant à elles deux variations allotypiques caractérisant les sous-classes Am1 et Am2.

L'allotypie des parties constantes des chaînes légères fut découvert en 1961 par C. Ropartz *et coll.* Cette allotypie ne concerne que les chaînes κ et correspond à des substitutions d'acides aminés en position 153 et 191. Ces substitutions engendrent trois spécificités différentes (Km1 à Km3).

c. Idiotypie

La variabilité idiotypique est une variabilité qui est associée au site de reconnaissance antigénique d'un anticorps. Elle implique donc les parties variables des chaînes lourdes et des chaînes légères. Un idiotype se définit comme un clone d'anticorps spécifiquement dirigé contre un antigène particulier.

4. structure des anticorps et lyse enzymatique

Les relations liant la structure d'une immunoglobuline à sa fonction biologique ont été élucidées en étudiant les fragments d'anticorps après l'action d'enzymes protéolytiques.

a. Action de la papaïne

Sous l'action de la papaïne, la molécule d'immunoglobuline est scindée en trois fragments : deux fragments Fab de taille similaire et un fragment Fc (Figure 7). Les fragments Fab (pour *antigen binding*) correspondent à la moitié N-terminale du peptide. Chaque fragment Fab est constitué d'une chaîne légère et d'un fragment de chaîne lourde, les deux étant reliés par des ponts disulfures. Les fragments Fab ont la propriété de se lier spécifiquement avec un antigène déterminé. Le fragment Fc (pour *crystallisable*) correspond aux deux moitiés C-terminales des chaînes lourdes reliées par un ou plusieurs ponts disulfures. Le fragment Fc a des fonctions biologiques telles que l'activation des protéines du complément ou la fixation à certaines cellules de l'immunité (via un récepteur Fc présent à la surface) permettant ainsi une activation de ces dernières.

b. Action de la pepsine

La pepsine coupe la molécule d'immunoglobuline en dessous du (ou des) pont(s) disulfure(s) qui relie(nt) les deux chaînes lourdes. Après action de la pepsine, on obtient un fragment de grande taille $(Fab')_2$, correspondant aux deux fragments Fab reliés par un ou plusieurs ponts disulfures, et des produits de dégradation du fragment Fc (Figure 7).

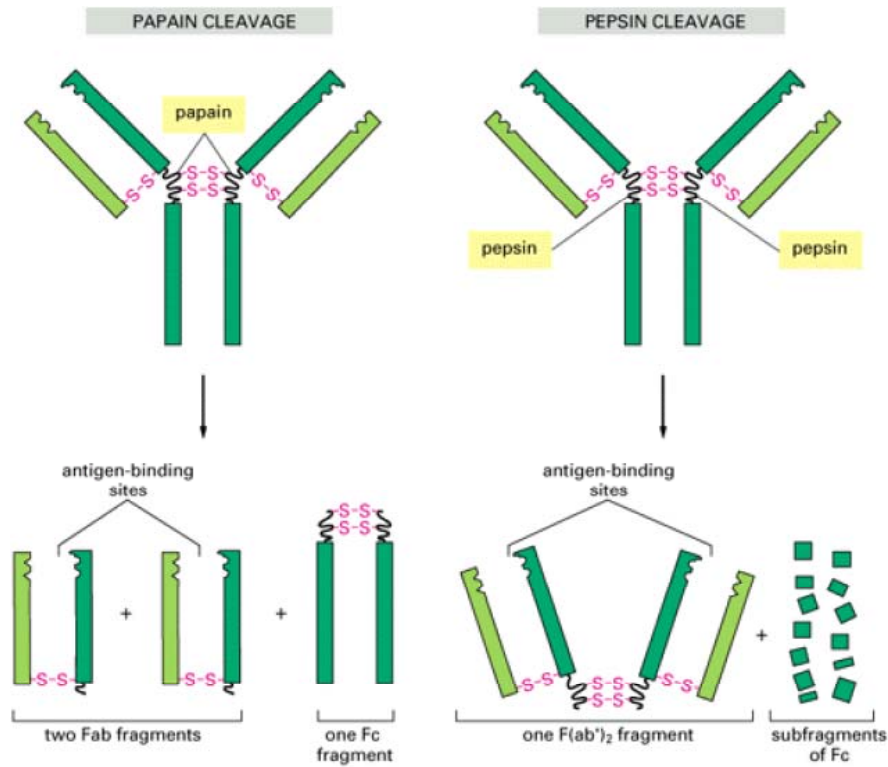


Figure 7 : Sites de clivages d'une immunoglobuline par la pepsine et par la papaïne et différents fragments obtenus [6].

5. Complexe Antigène-Anticorps

a. Spécificité-Affinité

Les antigènes sont des macromolécules naturelles ou synthétiques étrangères à un organisme, reconnues par ce dernier comme appartenant au « non-soi ». Ils entraînent une réaction immunitaire dont le but est leur élimination de l'organisme. La partie de l'antigène qui est reconnue par l'anticorps est dénommée « épitope ». Les antigènes sont généralement des protéines ou des polysaccharides. Dans le cas des protéines, l'épitope correspond le plus souvent à une séquence d'environ 12 à 18 acides aminés (Figure 8) qui peuvent soit se suivre de façon linéaire sur la chaîne peptidique (épitope séquentiel), soit être voisin après le repliement tridimensionnel de la protéine (épitope conformationnel). La spécificité de la reconnaissance anticorps-antigène réside dans la spécificité de la liaison épitope-paratope. Cette spécificité d'un anticorps pour son antigène doit être suffisamment importante afin de ne pas présenter de réactions croisées avec des antigènes voisins ni trop importante pour pouvoir bien détecter tous les antigènes contre lequel il est dirigés.

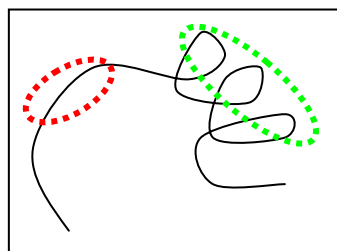
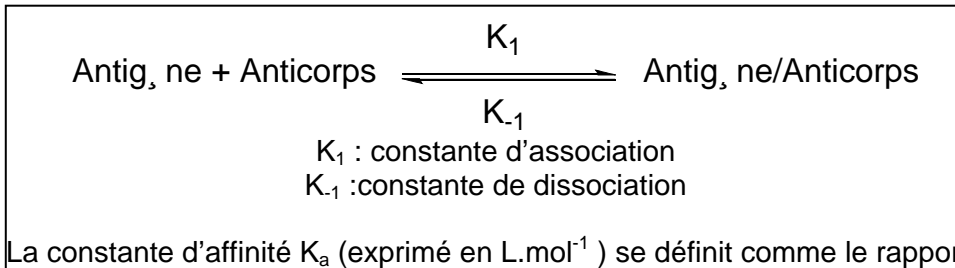


Figure 8 : Configuration spatiale des sites épitopiques. En rouge : épitope séquentiel ; en vert, épitope conformationnel.

Un antigène donné peut présenter plusieurs régions épitopiques différentes et être reconnu par plusieurs paratopes différents. Néanmoins, sur un même antigène, certains épitopes sont plus reconnus que d'autres, on parle alors d'épitopes immuno-dominants. Il s'agit, en général, d'épitopes situés en périphérie de l'antigène car ils sont, pour des raisons d'encombrement stérique, plus facilement accessibles. De plus, il est à noter que deux antigènes différents peuvent exprimer le même épitope. Un anticorps reconnaissant le premier antigène peut donc reconnaître le deuxième antigène, on parle alors de réaction croisée.

L'affinité d'un anticorps pour un antigène est définie par l'équation ci-dessous :



$$K_a = \frac{K_1}{K_{-1}} = \frac{[\text{Antigène / Anticorps}]}{[\text{Antigène}] \cdot [\text{Anticorps}]}$$

La constante d'affinité d'un antigène pour un anticorps varie de $10^4 L \cdot mol^{-1}$ (faible affinité) à $10^{11} L \cdot mol^{-1}$ (forte affinité). L'affinité est la somme des forces d'attraction et de répulsion qui s'établissent entre le paratope et l'épitope [7]. Physiologiquement, la quantité d'antigène est une donnée non maîtrisable mais la constante d'affinité et la concentration en anticorps sont des paramètres modulables. Il apparaît que plus la constante d'affinité est élevée, moins il faut de quantité d'anticorps pour obtenir une forte association antigène-anticorps. Il faut alors trouver le meilleur compromis entre l'affinité (K_a) et la spécificité de l'anticorps pour son antigène.

b. Immunogénicité et antigénicité

Une molécule est dite antigénique lorsqu'elle se fixe sur un paratope et est dite immunogénique lorsqu'elle provoque ou déclenche une réaction immunitaire. Les anticorps présentent ces deux caractéristiques. Ainsi, un anticorps d'origine murine injecté à un être humain déclenche à son encontre la synthèse d'anticorps humains anti-souris neutralisant les anticorps murins injectés.

Un haptène est une petite molécule (faible poids moléculaire) étrangère à l'organisme et qui est trop petite pour pouvoir déclencher une réaction immunitaire. Un haptène est donc antigénique mais pas immunogénique. Les haptènes peuvent être des sels de métaux lourds (nickel, chrome, argent...), des molécules organiques (acide penicilloïque...), etc...

L'haptène peut devenir immunogène après fixation à un porteur (« *carrier* ») de taille plus importante (une protéine le plus souvent). Dans ces conditions, on observe l'apparition d'anticorps spécifiques anti-haptène.

II. LES ANTICORPS MONOCLONAUX

A. ORIGINE ET PRODUCTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

Les biochimistes, à la recherche d'une préparation monoclonale d'anticorps qu'ils pourraient soumettre à une analyse chimique détaillée, se sont tournés vers les protéines produites par des patients atteints de myélome multiple. Un myélome est une tumeur de la moelle osseuse qui se manifeste par une prolifération anormale des plasmocytes. Cette pathologie dérive d'une cellule néoplasique unique et est par conséquent constituée d'un grand nombre de lymphocytes identiques. Tous les anticorps produits par ce clone sont aussi identiques et sont appelés anticorps monoclonaux. Toutefois, cette production pathologique et massive d'anticorps monoclonaux, dirigés contre un antigène inconnu, est inutilisable pour des applications diagnostiques (immunoanalyse) ou cliniques (immunothérapie). En effet, dans ces domaines, il est nécessaire de disposer d'anticorps dirigés contre un antigène bien défini. La solution fut apportée en 1979 et a valu le prix Nobel à leurs inventeurs : Georges Köhler et César Milstein. Leur invention est basée sur la fusion d'un lymphocyte B particulier produisant une immunoglobuline spécifique et d'une cellule de myélome. L'hybridome ainsi obtenu présente à la fois la capacité de proliférer de façon illimitée (immortalité due à la cellule de myélome) mais aussi la capacité de produire de grandes quantités d'anticorps spécifiques de l'antigène désiré (capacité due au lymphocyte B).

1. Production d'hybridomes spécifiques

Le principe de la production (Figure 9) repose sur l'injection d'un antigène d'intérêt chez un rongeur qui va développer une réaction immunitaire contre cet antigène. Il y aura production de lymphocytes B sécrétant des immunoglobulines spécifiques dirigées contre l'antigène injecté. Ces lymphocytes B sont récupérés dans la rate après splénectomie de l'animal.

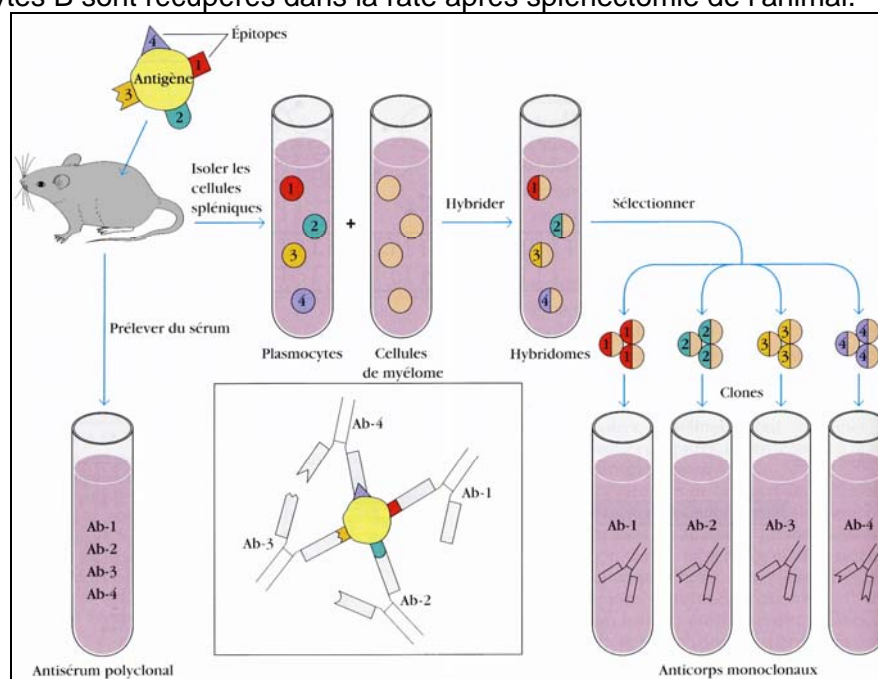


Figure 9 : Production d'anticorps monoclonaux à l'aide d'hybridomes par la méthode de Köhler et Milstein [8]

D'autres part, des cellules de myélome murin ont été sélectionnées pour leur propriétés non sécrétrices d'anticorps afin qu'elles n'interfèrent donc pas sur la production monoclonale du plasmocyte. Les membranes plasmatiques des cellules de myélome et des lymphocytes B récupérés sont fusionnées *in vitro* en présence de PEG (PolyEthylèneGlycol) ou d'un virus déficient de type virus Sendai. Les cellules ainsi formées, appelées hybridomes, exprimeront les caractères des deux lignées cellulaires parentales. Cependant, les cellules ne fusionnent pas toutes et le procédé conduit à un mélange complexe comprenant des cellules de myélome et des plasmocytes non fusionnés ainsi que des cellules fusionnées. Parmi les cellules fusionnées, trois combinaisons coexistent : la fusion de deux plasmocytes, de deux cellules de myélome et la fusion désirée plasmocyte-myélome.

Une méthode courante, permettant la sélection des hybridomes ainsi obtenus consiste à mettre le mélange de cellules en croissance sur un milieu de culture de type Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine (H.A.T.). Les cellules de myélomes utilisées pour la fusion ont été préalablement sélectionnées pour leur déficience en enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT). Les cellules eucaryotes disposent de deux voies pour synthétiser les nucléotides : la voie *de novo* et la voie de récupération. La voie *de novo* est bloquée par l'aminoptérine qui inhibe la voie du tétrahydrofolate nécessaire à la synthèse nucléosidique. Lorsque la voie *de novo* est inhibée, les cellules utilisent la voie de récupération qui contourne le blocage en incorporant directement les purines et les pyrimidines dans la synthèse des acides nucléiques. Les enzymes qui permettent la mise en place de cette voie de récupération sont : la thymidine kinase pour les bases pyrimidiques et l'hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase pour les bases puriques.

La sélection des hybridomes par le milieu H.A.T. (Figure 10) repose sur le fait que les cellules de myélome (fusionnées ou non entre elles) sont HGPRT⁻ et ne peuvent se développer. De plus, les plasmocytes (fusionnés ou non entre eux) requièrent la présence de facteur de croissance de type interleukine pour croître. Ainsi, seul l'hybridome d'intérêt qui possède l'enzyme HGPRT (apporté par le plasmocyte) et qui peut se développer sans interleukine croît sur le milieu H.A.T.

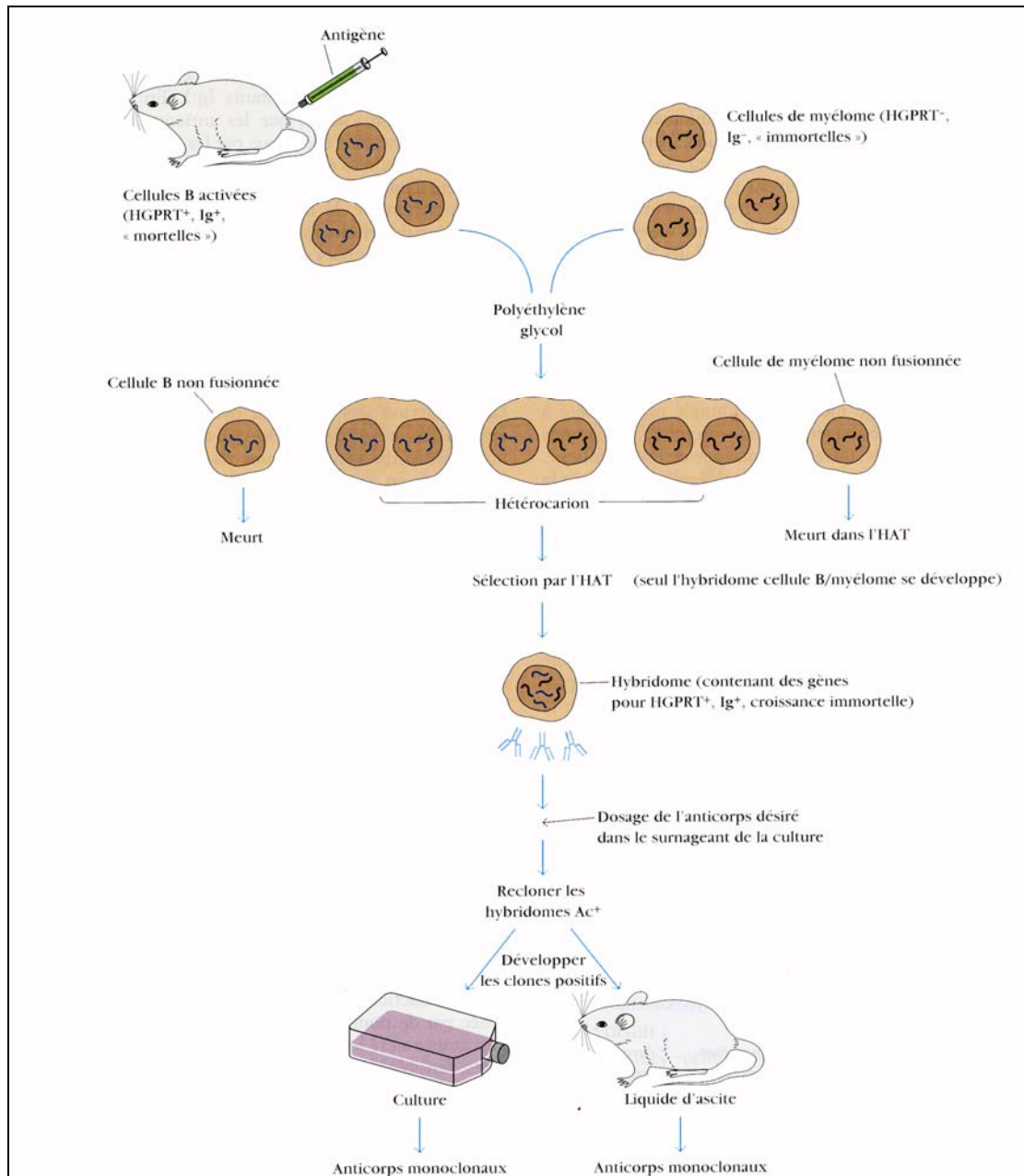


Figure 10 : Méthodes de sélection et de production des hybridomes myélome-plasmocyte sur milieu H.A.T. [8].

2. Sélection d'hybridomes spécifiques d'un antigène

Bien que certains hybridomes sécrètent l'anticorps spécifique de l'antigène d'intérêt, d'autres hybridomes (issus de plasmocytes spléniques non spécifiques) sécréteront des anticorps dirigés contre des antigènes (ou épitopes) non désirés. Il est donc nécessaire de réaliser un criblage (*screening*) des différents anticorps produits par les hybridomes. Ce criblage s'effectue à l'aide de dilution limite permettant d'obtenir un seul et unique hybridome par puits de culture [8].

L'anticorps monoclonal synthétisé dans chacun des puits de culture sera le plus souvent caractérisé par des techniques de type ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ou RIA (*radioimmunoassay*) qui utilisent un antigène purifié, bien caractérisé et immobilisé sur une phase solide, sur lequel vient se fixer uniquement l'anticorps d'intérêt. La révélation du complexe antigène-anticorps se faisant par un anticorps anti-Fc « traceur ».

3. Production des anticorps monoclonaux

Après l'identification des hybridomes ayant la spécificité désirée, ces derniers sont clonés par repiquage, puis cultivés selon différentes méthodes afin de produire l'anticorps monoclonal désiré.

Lorsqu'un hybridome est cultivé dans des flacons de culture cellulaire, l'anticorps sécrété dans le milieu est habituellement en très faible concentration (1-20 µg/mL).

Lorsqu'un hybridome est injecté dans la cavité péritonéale d'une souris, les concentrations en anticorps monoclonal retrouvées dans le liquide d'ascite sont plus élevées (1-10 mg/mL).

Pour répondre à la demande croissante d'anticorps monoclonaux, des techniques de croissance *in vitro* des cellules d'hybridome à de très hautes densités ($> 10^7$ /mL) ont été développées.

B. PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX D'ORIGINE HUMAINE

L'utilisation d'anticorps monoclonaux murins en thérapeutique humaine s'est très tôt heurtée à une difficulté majeure. En effet, les anticorps, synthétisés par la technique de Milstein et Köhler, présentent l'isotypie murine et lorsqu'ils sont injectés à un être humain, déclenchent chez ce dernier une réaction immunitaire avec la synthèse d'anticorps anti-isotype de souris : HAMA (*Human Anti-Mouse Antibodies*). Ces HAMA vont réduire l'efficacité du traitement en éliminant l'anticorps murin de la circulation générale. De plus, dans certains cas, une hyper-sensibilité (potentiellement létale dans le cas de choc anaphylactique) a été observée chez des patients.

La production d'anticorps monoclonaux présentant un isotype humain est donc apparue comme indispensable. Hélas, le développement de cette production a été bloqué par de nombreuses difficultés techniques. La plus importante a été le manque de cellules humaines immortelles, sensibles à la sélection par le milieu H.A.T., ne sécrétant pas d'anticorps et permettant la production d'anticorps dans un hybridome. Une alternative pour conférer l'immortalité à des lymphocytes B humains, sans passer par la fusion avec des cellules de myélome, consiste à infecter ces derniers par le virus d'Epstein-Barr (EBV). Le clonage de telles cellules activées transformées a permis la production d'anticorps monoclonaux humains, mais les quantités sécrétées sont généralement infimes et ne permettent pas une production industrielle.

Un autre problème est la difficulté d'obtenir facilement des plasmocytes à partir de tissus lymphoïdes humains équivalents à la rate de souris. Les hybridomes humains-murins sont préparés à partir de sang périphérique humain qui ne contient que très peu de plasmocytes engagés dans une réponse immunitaire spécifique. De plus, l'éventail d'antigène utilisable s'avère beaucoup plus restreint que celui utilisable chez l'animal.

Pour contourner cette difficulté, des cellules humaines en culture peuvent être activées *in vitro* par l'antigène. Cette technique ne conserve pas le micro-environnement physiologique du tissu lymphoïde et on ne récupère qu'un anticorps de type IgM avec une faible affinité pour l'antigène.

Enfin, une dernière méthode consiste à transplanter des lymphocytes B humains activés *in vitro* à des souris dépourvues de système immunitaire (souris SCID). Compte tenu de l'ensemble de ces difficultés et des faibles rendements de production obtenus avec les différentes options décrites, les chercheurs se sont orientés, en lien avec le développement des techniques de génétique, sur l'obtention d'anticorps monoclonaux hybrides, comportant une partie murine et une partie humaine [8].

1. Anticorps monoclonaux chimériques ou humanisés

La production d'anticorps monoclonaux chimériques homme-souris est le fruit de l'utilisation du génie génétique en biologie. La préparation de ces anticorps s'effectue en recombinant les séquences promotrices et codantes des régions variables d'un anticorps de souris avec les exons codant pour les régions constantes d'un anticorps humain. L'anticorps codé par ce gène recombiné est une chimère homme-souris. La spécificité antigénique de cet anticorps, qui est déterminé par sa région variable, vient de l'ADN murin. L'isotypie de cet anticorps, qui est déterminé par sa région constante, est issu de l'ADN humain. Les immunoglobulines ainsi produites sont beaucoup moins antigéniques que les anticorps monoclonaux de souris lorsqu'ils sont administrés à l'homme. Néanmoins, l'administration à un patient de ce type d'anticorps peut induire la synthèse d'anticorps humain anti-anticorps chimérique : HACA (*Human Anti-Chimeric Antibody*). Afin de réduire cet inconvénient, il a été synthétisé des anticorps dit « humanisés » où seules les régions hypervariables CDR sont d'origine murine. Qu'ils soient chimériques ou humains, l'avantage de ces anticorps est qu'ils ont conservé les fonctions biologiques effectrices de l'anticorps humain et sont ainsi plus susceptibles de déclencher l'activation du complément ou la liaison aux récepteurs du fragment Fc (Figure 11 et 12).

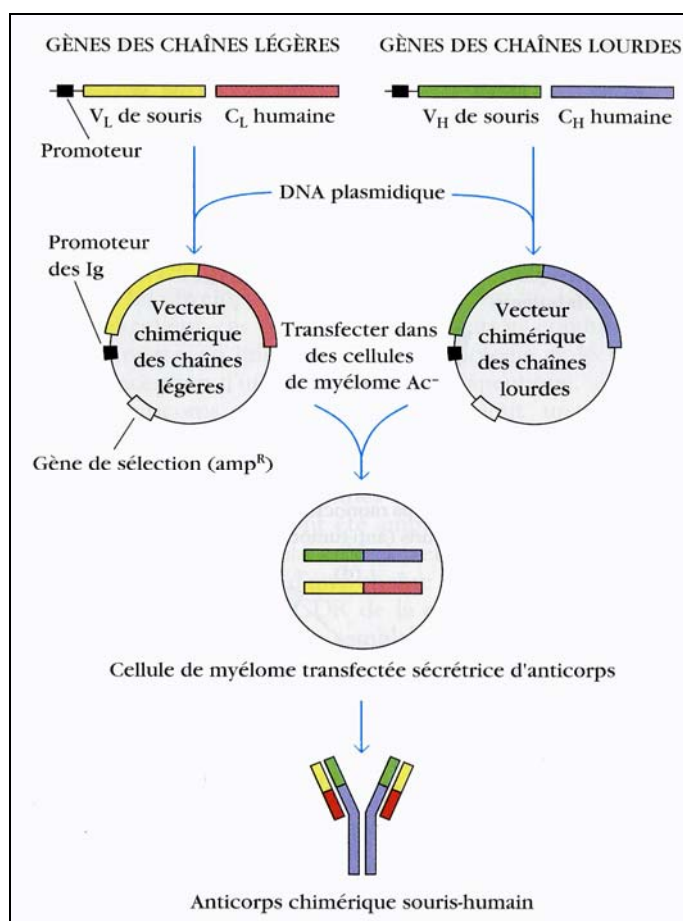


Figure 11 : Production d'anticorps chimériques souris-humains par génie génétique [9].

2. Techniques en cours de développement

Des anticorps bispécifiques, dit « hétéroconjugués » car présentant deux paratopes spécifiques de deux antigènes différents ont été synthétisés. Ce sont des hybrides de deux molécules différentes d'immunoglobulines qui sont synthétisés soit en pontant chimiquement deux anticorps, soit dans des hybridomes constitués de deux lignées cellulaires fusionnées

productrices d'anticorps monoclonaux différents. Le développement de cette technique a permis d'obtenir des anticorps spécifiques à la fois d'un antigène tumoral et d'un lymphocyte T (Figure 12). L'utilisation de cette méthodologie bispécifique a permis une amélioration de la réponse immunitaire anti-tumorale par activation des cellules cytotoxiques dans le traitement d'adénocarcinomes prostatiques [10].

Un autre développement des anticorps monoclonaux humanisés a été la préparation d'anticorps, où le domaine terminal de la région constante a été remplacé par une toxine, dénommé immunotoxines (Figure 12). L'immunotoxine ainsi obtenue ne peut plus se lier aux cellules porteuses du récepteur Fc, mais elle présente un grand potentiel toxique pour les cellules qui expriment l'antigène sur lesquelles le paratope se fixe. Un anticorps actuellement sous autorisation temporaire d'utilisation (Mylotarg®) utilise ce principe et permet de vectoriser un antibiotique anti-tumoral (l'ozogamicine) sur des cellules de leucémie myéloïde chronique [11].

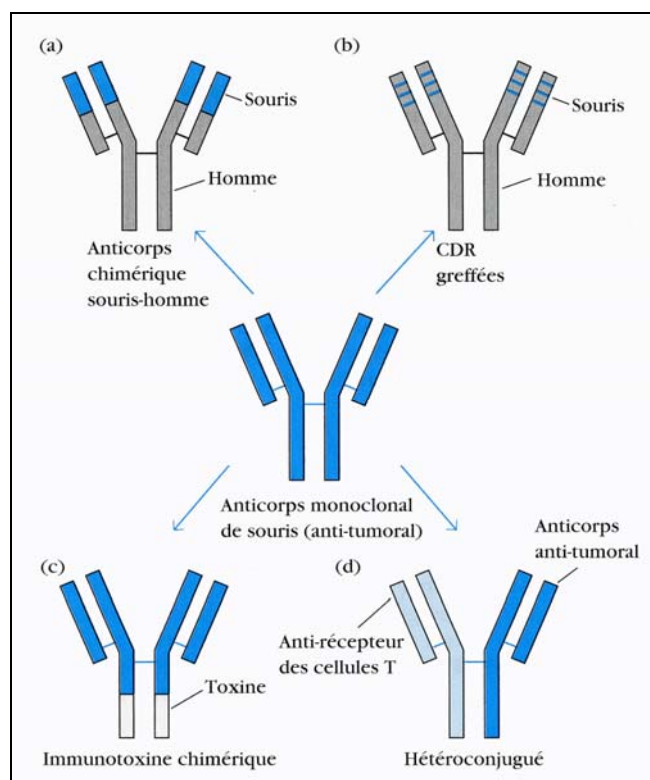


Figure 12 : Anticorps monoclonaux modifiés [9].

Une nouvelle approche dans la préparation d'anticorps monoclonaux consiste à amplifier par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) l'ADN codant pour les domaines variables des chaînes lourdes (VH) et légères (VL). Une région promotrice et un site de restriction sont insérés aux séquences amplifiées et les constructions résultantes sont insérées dans un bactériophage. Cette méthode dite du « phage display » [12] permet d'obtenir des banques combinatoires de fragments d'anticorps sélectionnés en fonction de leur affinité pour l'antigène choisi. Les domaines variables de l'anticorps ainsi préparés sont exprimés à la surface du phage, soit sous forme de fragment Fab, sous forme de fragments scFv (*Single Chain Fv*) dans lesquels les domaines VH et VL sont liés de façon covalente par un court peptide, ou sous forme dsFv (*disulfur Fv*) où les domaines VH et VL sont liés par un pont disulfure.

Enfin, les assemblages scFv et dsFv peuvent être polymérisés entre eux pour obtenir, selon le type de jonction (Figure 13) des fragments (scFv)₂, ds(scFv)₂, diabodies ou triabodies qui présentent l'avantage d'être di ou trivalents, mono ou bi-spécifiques [13]. Une très grande diversité d'anticorps de l'ordre de 10¹⁰ a été obtenue par cette méthode. Cependant, cette technique ne permet pas pour le moment la production à l'échelle industrielle d'anticorps monoclonaux.

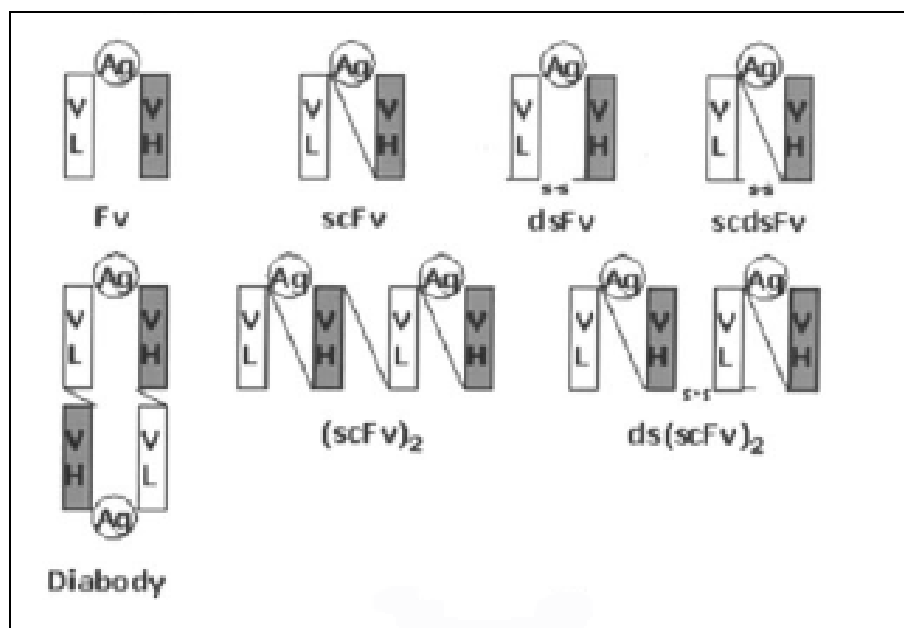


Figure 13 : Représentation des différentes formes d'anticorps avec leurs sites de liaisons à l'antigène (Ag) obtenus par la technique du phage display en fonction des types de liaisons entre les chaînes lourdes (VH) et les chaînes légères (VL) [14].

Une autre méthode utilisant des souris génétiquement modifiées est en cours d'étude. En effet, il est possible d'inactiver les loci des chaînes lourdes et des chaînes légères dans les cellules souches embryonnaires de souris. En insérant par la suite de grandes séquences d'ADN (80 kb) contenant les séquences humaines dans le génome de la souris, on obtiendra des souris transgéniques productrices d'anticorps totalement humains dont les lymphocytes B fourniront des anticorps monoclonaux après fusion dans des hybridomes.

C. CLASSIFICATION

Dans les années 1980, la nécessité de donner un nom aux anticorps monoclonaux est apparue. Les immunohématologistes ont défini une nomenclature qui distingue des familles d'anticorps selon leur site de reconnaissance antigénique. Cette technique de *clustering* répartit les familles d'anticorps selon une arborescence constituée de cluster de différenciation ou CD. Les CD désignent à la fois le nom de la molécule reconnue et l'ensemble des anticorps monoclonaux qui la reconnaissent.

L'utilisation d'anticorps monoclonaux en thérapeutique a conduit l'OMS à statuer sur une codification terminologique des dénominations communes internationales (Tableau 2) :

Tableau 2 : Nomenclature internationale des anticorps monoclonaux.

Préfixe	Cible		Source		Suffixe
	Code	Signification	Code	Signification	
Variable	-vi(r)-	Virale			-mab
	-ba(c)-	Bactérien			
	-li(m)-	Immunitaire			
	-le(s)-	Infectieux	-u-	Humain	
	-ci(r)-	Cardiovasculaire	-o-	Murin	
	-co(l)-	Tumeur colique	-a-	Rat	
	-me(l)-	Mélanome	-e-	Hamster	
	-ma(r)-	Tumeur mammaire	-i-	Primate	
	-go(t)-	Tumeur testiculaire	-xi-	Chimérique	
	-go(v)-	Tumeur ovarienne	-zu-	Humanisé	
	-pr(o)-	Tumeur prostate			
	-tu(m)-	Tumeurs diverses			

D. INDICATIONS THERAPEUTIQUES

Les anticorps ont trouvé des applications thérapeutiques dès 1890 en sérothérapie dans le traitement des symptômes diphtériques (anticorps anti-toxine diphtérique). La sérothérapie a ainsi ouvert la voie de l'utilisation des anticorps sous leur forme polyclonale obtenue à partir de sérum de moutons ou de chevaux.

Le premier anticorps monoclonal utilisé en médecine (AMM délivrée par l'AFSSaPS en 1996) est un médicament d'urgence : le Digidot[®], il s'agit de fragments Fab d'une immunoglobuline ovine dirigée contre les hétérosides cardiotoniques dans les cas d'intoxication aiguë aux digitaliques. L'action de ce médicament repose sur une liaison rapide et quasi complète de la fraction libre de l'hétéroside cardiotonique présent dans le liquide extracellulaire, où il est neutralisé durablement par l'anticorps.

Les anticorps monoclonaux à visée thérapeutique (immunothérapie) représentent une part importante (environ 25 %) des biomolécules pharmaceutiques entrées en phase clinique avancée (phase II ou III) ou arrivant sur le marché. La pharmacopée française dénombre en fin d'année 2006, 16 anticorps monoclonaux titulaires de l'AMM et 3 titulaires d'une ATU (Annexe I) ainsi qu'environ 80 anticorps en cours d'évaluation clinique. Par ailleurs, on estime à plus de 500 le nombre de projets de développement d'anticorps monoclonaux mené par 200 sociétés dans le monde.

Dans le domaine immunologique, les anticorps monoclonaux ont trouvé des indications cliniques dans la régulation du système immunitaire lorsque celui-ci n'est pathologiquement plus capable de différencier le « soi » du « non-soi » (cas des pathologies auto-immunes) ou lorsque l'activité du système immunitaire doit être réduite afin d'éviter le rejet d'une allogreffe. D'autres pathologies présentant une médiation immunitaire comme l'asthme ou le psoriasis peuvent, dans certaines formes résistantes aux thérapeutiques classiques, être traitées par des anticorps monoclonaux.

Dans le domaine de l'oncologie, la réponse immunitaire physiologique anti-tumorale d'un individu est insuffisante. En effet, issues d'un clone cellulaire appartenant au « soi », les cellules tumorales sont peu antigéniques, et ne sont par conséquent que faiblement immunogènes.

Néanmoins, une cellule cancéreuse peut synthétiser diverses protéines de façon anormale pouvant constituer un site antigénique :

- Protéines onco-foetales habituellement non accessibles dans les conditions physiologiques (ex : antigène carcino-embryonnaire (ACE) dans certains cancers colo-rectaux),
- Surexpression d'antigènes présent physiologiquement à la surface de la cellule cancéreuse (ex : glycoprotéine CD20 surexprimée sur les cellules de lymphomes malins non-Hodgkiniens),
- Antigènes viraux lorsque le développement tumoral est associé à un virus,
- Modification d'antigènes épithéliaux lors de la croissance anarchique tumorale (ex : modification des sucres sur la protéine mucine-1, MUC1 dans certains carcinomes).

Une action anti-cancéreuse directe peut être obtenue en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre ces onco-antigènes. De plus, une action anti-tumorale indirecte des anticorps monoclonaux peut être observée en ciblant le microenvironnement nécessaire au développement néoplasique. Parmi les différents antigènes ciblés dans le microenvironnement tumoral, on peut citer par exemple le *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)* responsable de la néo-vascularisation tumorale et l'*Epidermic Growth Factor Receptor (EGFR)* responsable de la croissance du tissu de soutien cancéreux.

L'utilisation d'un anticorps monoclonal spécifiquement dirigé contre l'un de ces différents antigènes tumoraux est responsable d'un effet anti-néoplasique dont le mécanisme peut être, par exemple :

- l'entrée en mode apoptotique de la cellule cancéreuse,
- la stimulation spécifique de récepteurs tumoraux,
- la phagocytose du complexe antigène-anticorps par un macrophage,
- la lyse du complexe antigène-anticorps par le système du complément,
- la cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante (*Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity : ADCC*).

Si l'immunothérapie a démontré une réelle efficacité dans le traitement de certains types de tumeurs, cet effet est aujourd'hui optimisé par l'utilisation des anticorps monoclonaux en tant que vecteur d'agent tumoricide. Parmi les différents agents tumoricides utilisés, on trouve des antibiotiques antitumoraux comme la Calicheamicin dans le Mylotarg® (actuellement titulaire d'une ATU) et des atomes radioactifs comme l'yttrium-90 dans le Zevalin® (AMM en 2004).

La suite de ce mémoire se consacrera à cette utilisation radiopharmaceutique des vecteurs immunologiques permettant de détruire spécifiquement les cellules cancéreuses par irradiation.

DEUXIEME PARTIE : VECTEURS IMMUNOLOGIQUES RADIOMARQUES

I. PRINCIPES METHODOLOGIQUES

A. INTRODUCTION

Comme nous l'avons vu dans la première partie de ce mémoire, l'utilisation de l'immunothérapie dans des indications oncologiques est aujourd'hui une méthodologie courante. La médecine nucléaire, à la recherche de vecteurs spécifiques d'une cible cellulaire, a très tôt utilisé ce potentiel des immunoglobulines dans un but de localisation de foyers tumoraux. Dans un premier temps, différentes techniques d'imagerie immunoscintigraphique utilisant un radionucléide couplé à un anticorps dirigé contre l'antigène carcino-embryonnaire ont été mises au point [15]. La principale limite au développement de ce type d'exploration fut d'une part l'absence de solution thérapeutique proposée et la limite technologique due aux gamma-caméras. En effet, les images obtenues présentaient un faible rapport signal/bruit engendrant de fait, un faible contraste par rapport au développement technique très rapide de la radiologie anatomique dans les bilans tumoraux. Dans un second temps, parallèlement à l'évolution technologique des moyens de détection en médecine nucléaire, l'utilisation d'anticorps dirigés contre les thrombocytes ont permis de développer des indications dans la visualisation des thrombus d'embolies pulmonaires [16]. Aujourd'hui en clinique, seuls des anticorps dirigés contre les granulocytes possèdent une AMM en médecine nucléaire. Ils sont utilisés dans la détermination scintigraphique d'infection ou d'inflammation osseuse chez les patients suspectés d'être atteints d'ostéomyélite [17].

Parallèlement à cette utilisation immunoscintigraphique, la mise à disposition de nouveaux isotopes à visée thérapeutique ont permis d'utiliser différents immunovecteurs pour détruire des cellules cancéreuses par irradiation (Radio-ImmunoThérapie : RIT). C'est ainsi que le Zevalin[®], anticorps monoclonal dirigé contre la phosphoprotéine CD20 situé à la surface des lymphocytes, a obtenu l'AMM en 2004 pour le traitement des formes réfractaires et résistantes de lymphomes malins non-Hodgkiniens [18].

B. EFFETS BIOLOGIQUES DES RAYONNEMENTS IONISANTS

1. Effets Cellulaires

Une cellule se développe et se réplique suivant un cycle divisé en cinq phases distinctes (Figure 14). Une phase G_1 de croissance régulée de la cellule précédant une phase de synthèse S de l'ADN permettant de doubler le matériel génétique suivi d'une phase G_2 où la cellule se prépare à la division mitotique, phase M, durant laquelle la cellule mère va se diviser en deux cellules filles possédant le même patrimoine génétique que la cellule mère. À l'issue de cette division mitotique, les cellules filles peuvent soit entrer à nouveau en phase G_1 ou bien rester à l'état quiescent (phase G_0). Dans une cellule cancéreuse, la phase G_0 est inexistante et le cycle cellulaire est accéléré.

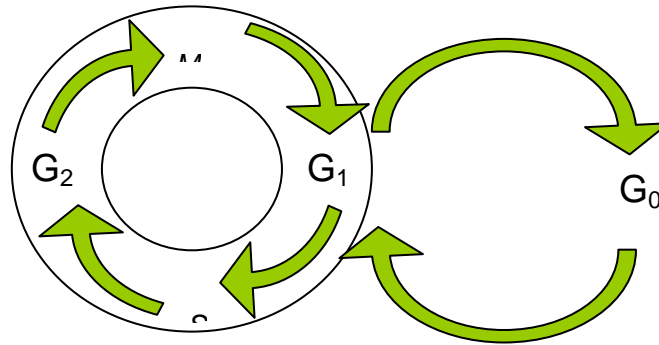


Figure 14 : Cycle cellulaire. G₀ : Phase quiescente, G₁ : Phase de croissance cellulaire, S : Synthèse d'ADN, G₂ : Phase de préparation à la mitose, M : Mitose

L'exposition d'une cellule aux rayonnements ionisants peut avoir plusieurs conséquences. Il est unanimement admis que l'ADN, en tant que support de l'information génétique, constitue la cible principale. La lésion élémentaire directe que peut subir la molécule d'ADN est la cassure d'un des deux brins qui est facile à réparer puisque la matrice est intacte sur le brin complémentaire. Il est à noter que la cassure des deux brins complémentaires à proximité l'une de l'autre est un événement rare non-réparable mais induisant la mort de la cellule. Le plus souvent, le rayonnement ionisant va rompre une molécule d'eau avec formation de radicaux libres. Ce sont ces radicaux qui, lorsqu'ils sont produits à proximité d'une molécule d'ADN, vont scinder cette dernière de façon indirecte (Figure 15). Au cours du cycle cellulaire, la transition G₁-S, la phase S et la transition G₂-M sont des étapes particulièrement radiosensibles dans la vie d'une cellule [19].

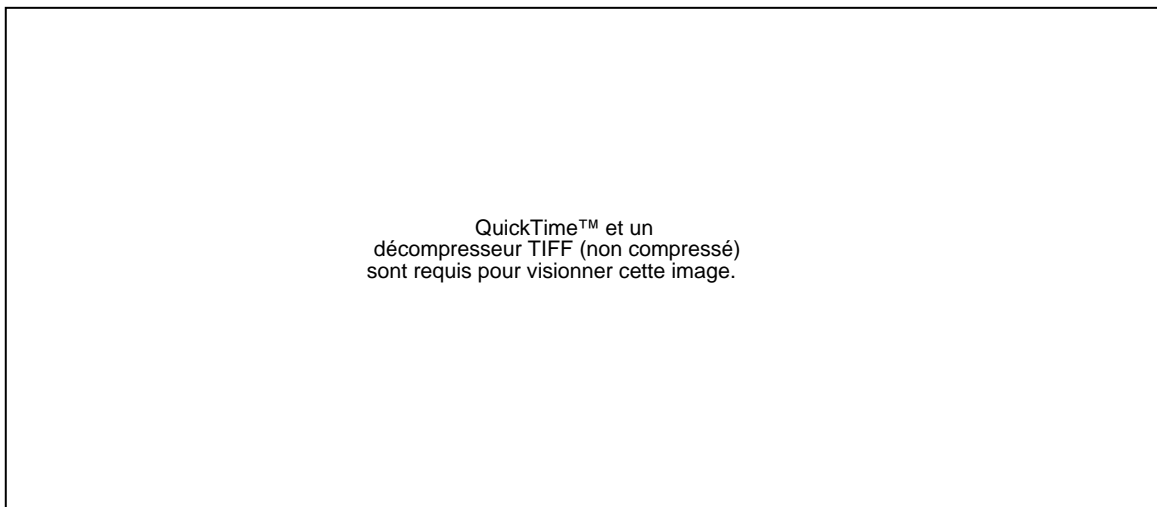


Figure 15 : Effets directs (à droite) et indirects (à gauche) des rayonnements ionisants sur l'ADN.

Quel que soit le type de lésions, les mécanismes de réparation sont activés mais lorsque le nombre de ces lésions est trop important, la machinerie cellulaire est submergée et des réparations non conformes à l'original (mutations létales ou non) peuvent apparaître. Dans de rares cas, cette mutation pourra progressivement dégénérer (Figure 16) et mener la cellule vers un processus cancéreux (dérégulation de la prolifération, immortalisation et inactivation de l'apoptose).



QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 16 : Effets directs et indirects des rayonnements ionisants sur une cellule.

L'apoptose est un mécanisme cellulaire résultant de l'activation d'une voie particulière aboutissant à la production d'endonucléases qui lysent l'ADN conduisant ainsi à la destruction de la cellule. Ce mécanisme est activé (Figure 17) dès que les lésions génomiques sont détectées, mais aussi par l'intermédiaire de signaux extra cellulaires (cytokines, récepteurs du TNFR,...) et de signaux de dégradation de la membrane cellulaire (voie du céramide).

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 17 : Mécanismes d'entrée en apoptose d'une cellule exposée aux rayonnements ionisants. La protéine p53 peut induire un arrêt du cycle cellulaire, une réparation de l'ADN ou une entrée en apoptose. Cette activation de la protéine p53 est dépendante des dommages subit par l'ADN, des protéines du « sensor-system », de la protéine Bcl2 anti-apoptotique et des récepteurs de certaines cytokines. Le céramide, issu de l'hydrolyse de la sphingomyeline, est un second messenger induisant la mort de la cellule par activation de la protéine c-jun amino terminal kinase (JUN). La mitochondrie est également un site sensible aux radiations par l'intermédiaire du relargage de facteurs pro-apoptotique (AIF) et de cytochrome C. L'apoptose peut également être déclenchée par la formation de peroxydes (ROS : Reactive Oxygen Species) [19].

Lorsque les réparations sont suffisamment rapides (faible densité des radiolésions), la voie apoptotique est inhibée avant d'avoir atteint son point de non-retour. À l'inverse, en cas de dommages étendus, la voie apoptotique aura de grandes chances d'aboutir à l'autodestruction de la cellule avant que l'ADN ne soit réparé. Il faut ajouter que le risque de réparation infidèle dépend aussi de la densité des radiolésions. Par conséquent, l'entrée en apoptose est un mécanisme de sauvegarde cellulaire diminuant le risque que le génome endommagé soit transmis à la descendance.

2. Effets tissulaires

Les tissus étant constitués de cellules, la perte cellulaire consécutive à une irradiation va entraîner certaines conséquences fonctionnelles variables selon le degré de différenciation des cellules atteintes. Ainsi, les tissus « compartimentaux », comme la peau, l'intestin ou la moelle osseuse sont relativement radiosensibles. En effet, ce type de tissus comporte un compartiment de cellules souches pluripotentes (non différenciées), un compartiment intermédiaire de maturation (amplification des cellules) et un compartiment fonctionnel (cellules différenciées). Dans ce type de tissus, le flux cellulaire va toujours des cellules souches vers le compartiment

fonctionnel. Les dommages causés par l'irradiation de ce type de tissus constituent les effets dose-dépendants dits « déterministes » car prévisibles de l'irradiation des cellules souches (hémorragie digestive, aplasie médullaire, brûlure radiologique,...). Le délai d'apparition de ces effets est directement lié au temps nécessaire à la maturation des cellules souches.

Lorsque l'irradiation (à des doses plus faibles) ne provoque pas la mort de la cellule, les mutations engendrées peuvent rester quiescentes et conduire, dans un temps indéfini, la cellule vers un processus cancéreux. Il s'agit d'un facteur de risque à survenue aléatoire, effet « stochastique », non dose-dépendant.

3. Notion de dosimétrie

Lorsqu'un acte utilisant des rayonnements ionisants en médecine est pratiqué, le praticien ayant réalisé l'examen doit pouvoir préciser qu'elle est la dose exacte délivrée aux tissus. Cette dose dépend de plusieurs paramètres dont l'activité totale injectée, la demie-vie du radioélément ainsi que la nature de son rayonnement.

Dans le cas des examens scintigraphiques, les isotopes utilisés peuvent être des émetteurs de photons gamma (ex : technétium-99m) qui ont un très long parcours dans la matière et dépose relativement peu d'énergie par unité de distance dans le corps du patient. Leur transfert d'énergie linéique (TEL) est considéré comme faible et la majorité des rayonnements sortent du patient pour être détectés par la gamma-caméra ce qui conduit à une dose délivrée aux tissus sains relativement faible.

Pour la technique d'imagerie par tomographie d'émission de positon (TEP), les isotopes utilisés sont des émetteurs de positons (ex : fluor-18). Les positons (β^+) s'annihilent en présence d'électrons et l'on observe la formation de deux photons énergétiques. Ces photons présentent un TEL relativement faible et ils sortent du patient pour pouvoir être détectés. La dosimétrie est en général plus défavorable que celle obtenue au cours d'examens scintigraphiques classiques car les photons émis sont plus énergétiques.

Lors de la mise en œuvre d'une radiothérapie métabolique, le but est de détruire un tissu cancéreux, dans ce cas, on utilise des isotopes émetteurs de particules β^- (ex : iode-131). Ce type de particules parcourt une faible distance dans l'organisme et reste par conséquent à proximité de leur lieu d'émission. Ce type de particules présente un TEL élevé et toute l'énergie est déposée dans un faible volume. La dosimétrie est élevée dans ce volume restreint et on observe par conséquent d'importants dommages cellulaires.

La dosimétrie et les effets biologiques relatifs (EBR) étant d'autant plus importants que le TEL est élevé [20], l'idée d'utiliser des isotopes émetteurs de particules α est apparue. Les isotopes émetteurs de particules α (ex : astate-211) présentent la caractéristique d'émettre des particules volumineuses (noyaux d'hélium) plus énergétiques et parcourant moins de distance que les particules β^- .

C. IMMUNOVECTORISATION EN ONCOLOGIE

1. Rappels

Les différents objectifs de l'immunovectorisation d'un radio-isotope peuvent être de visualiser des cibles tumorales avec un bon contraste par rapport aux tissus sains ou d'irradier une cible tumorale en minimisant la dosimétrie aux tissus sains. Dans ces deux cas (diagnostic et thérapeutique), l'objectif est atteint grâce à la spécificité du vecteur qui ne se lie que sur les cellules d'intérêt. L'efficacité de cette technique dépend de quatre principaux paramètres dont deux font intervenir les propriétés de la cible tumorale, avec d'une part les propriétés de l'antigène tumoral ciblé (localisation, densité et expression) et d'autre part la nature même de la tumeur (radiosensibilité, taille, vascularisation et taux de prolifération). Les deux autres éléments concernent le radiopharmaceutique : nature du vecteur (spécificité, affinité, dose, immunoréactivité et pharmacocinétique) et propriété du radionucléide (période, type d'émission, stabilité et pureté radiochimique du marquage).

2. L'antigène tumoral

Afin d'avoir une vectorisation optimale sur la cellule tumorale, il est primordial que l'antigène ne soit pas sécrété, et qu'il soit accessible, exprimé fortement de façon constante et homogène à la surface de la cellule cancéreuse, à l'exclusion de toute autre cellule saine. Ces conditions théoriques sont difficiles à obtenir car la plupart du temps, les antigènes ne sont pas spécifiques d'une tumeur et sont exprimés de façon physiologique par des cellules saines.

Néanmoins, comme nous l'avons vu dans la première partie de ce mémoire, la cellule cancéreuse peut surexprimer certains antigènes de surface (ex : glycoprotéine CD20 surexprimée sur les cellules de lymphomes malins non-Hodgkiniens). La cellule néoplasique peut également exprimer des antigènes fœtaux comme l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) ou l'alphafœtoprotéine (AFP) inaccessibles dans les conditions physiologiques.

Des antigènes présents dans le microenvironnement tumoral peuvent également servir de cible. Parmi ceux-ci, on peut citer à titre d'exemple le facteur de croissance épidermique humain (HER-2) ou le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) responsable de la néo-vascularisation tumorale.

Enfin, une augmentation de l'expression antigénique (et donc de la fixation tumorale du radio-immunoconjugué) est possible grâce à l'utilisation de certaines cytokines (ex : association interférons alpha ($INF\alpha$) et gamma ($INF\gamma$) dans des modèles de carcinomes ovariens) [21].

3. La tumeur

La néovascularisation tumorale est hétérogène et se développe de façon anarchique avec la présence de capillaires fenestrés, non fenestrés et discontinus, de vaisseaux sans revêtement endothélial, de bourgeons capillaires et de shunt artério-veineux. Au total, à la différence des vaisseaux normaux, les vaisseaux tumoraux sont dilatés, sacculaires, tortueux et peuvent contenir des cellules tumorales dans leur revêtement endothélial. Dans cet espace vasculaire désorganisé, le flux sanguin est en moyenne diminué par rapport aux tissus normaux et cette diminution peut varier exponentiellement avec l'augmentation de la taille des tumeurs et

les flux sont très hétérogènes avec une zone nécrotique au centre de la masse tumorale et une zone bien vascularisée en périphérie. À ces différentes contraintes s'ajoute une élévation de la pression interstitielle au sein de la tumeur ayant pour effet de limiter l'extravasation de l'anticorps du capillaire vers le liquide interstitiel. Néanmoins, l'utilisation d'agents physiques (chaleur) ou chimiques (médicaments vasoactifs) peut augmenter, au moins transitoirement, le flux sanguin et la perméabilité vasculaire de la tumeur. D'autres approches, comme l'utilisation de hyaluronidase ou de *Tumor Necrosis Factor (TNF)* peuvent diminuer la pression interstitielle dans la tumeur et ainsi d'améliorer la distribution du vecteur dans la tumeur.

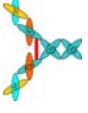
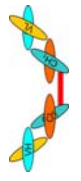


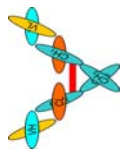
De plus, dans le cas de la thérapie, l'efficacité dépend de la radiosensibilité de la tumeur qui est directement liée aux capacités intrinsèques de la cellule à réparer les dommages causés par un rayonnement ionisant. En effet, il existe une corrélation entre la vitesse de croissance de la tumeur et la résistance à l'irradiation. Ainsi, les métastases à croissance rapide sont plus sensibles à l'irradiation que les métastases à croissance lente. De plus, chaque type de cellules diffère quant à son potentiel de réparation de lésions potentiellement létales ou sublétales radio-induites. Il s'avère que la radiosensibilité intrinsèque varie entre les différents types histologiques mais aussi au cours de la croissance tumorale. Ainsi, par exemple, le neuroblastome ou le cancer du poumon à petites cellules sont réputés très radiosensibles alors que les cancers coliques sont relativement radiorésistants [22, 23]. Il est à noter que la zone centrale nécrotique de la tumeur est hypoxique et par conséquent plus radiorésistante. Enfin, l'utilisation de vecteurs radiomarqués à visée thérapeutique peut permettre, malgré une mauvaise pénétration, d'irradier le microenvironnement tumoral et ainsi d'induire une apoptose tumorale, soit par effet de voisinage « bystander effect » (sécrétion de cytokines) [24] soit en privant la tumeur de son tissu de soutien (néo-vascularisation par exemple).

4. L'ImmunoVecteur

Afin d'obtenir des anticorps moins immunogènes (moindre production de HAMA et par conséquent, possibilité de multiplier le nombre d'injection) l'ingénierie moléculaire a permis de produire des anticorps chimériques puis humanisés .

La spécificité et l'affinité de l'anticorps pour l'antigène tumoral déterminent sa fixation au niveau tumoral. La forme de l'anticorps utilisé, immunoglobuline entière ou fragmentée, détermine son comportement pharmacocinétique et sa biodistribution. Afin de moduler ses différentes propriétés, l'ingénierie des anticorps a su fragmenter par protéolyse les anticorps en ne conservant que les parties Fab et Fab'2. Le génie génétique a permis la conception de fragment scFv (où seuls les parties variables sont conservées) ou de composés dit « minibody » entièrement synthétiques (Tableau 3). Le fait de réduire la taille des immunovecteurs a pour effet d'augmenter la pénétration intra-tumorale avec en contre-partie une accélération de la pharmacocinétique du vecteur potentiellement non compatible avec une irradiation efficace. [14].

Tableau 3 : différents types d'anticorps utilisés en thérapeutique.

Nom	Immunoglobuline (IgG)				Fragment F(ab') ₂	Fragment Fab	Fragment recombinant scFv (single chain Fv)	minibodies
	mutin	Chimérique murin-humain	humanisé	humain				
Schéma								
Taille approximative	150 kDa	150 kDa	150 kDa	150 kDa	100 kDa	50 kDa	28 kDa	70-80 kDa
Valence	Monospécifique Bivalent	Monospécifique Bivalent	Monospécifique Bivalent	Monospécifique Bivalent	Monospécifique Bivalent	Monospécifique monovalent	Monospécifique monovalent	Monospécifique bivalent ou bispécifique monovalent
Immunogénicité potentielle	+++	++	(+) à priori non immunogène pour l'homme	(+) non immunogène pour l'homme	++	+	(+)	nd
Affinité	10^9 à 10^{11} M ⁻¹	10^9 à 10^{11} M ⁻¹	10^9 à 10^{11} M ⁻¹	10^9 à 10^{11} M ⁻¹	10^9 à 10^{11} M ⁻¹	10^9 à 10^{11} M ⁻¹	diminuée	
Avantages/ Inconvénients	Demi-vie courte Immunogène chez l'homme avec apparition de HAMA	Immunogène chez l'homme avec apparition de HACA	Réaction antidiotypique possible avec apparition de HANA	Réaction antidiotypique possible	Réactions avec le système immunitaire de l'organisme diminué, Evite la fixation aspécifique sur les tissus sains par le fragment Fc	Pharmacocinétique rapide : atteint vite la cible, élimination rapide, accumulation dans les cellules tumorales pérvasculaires	Bonne pénétration tissulaire, accumulation dans les cellules tumorales pérvasculaires. Demi-vie très courte et peu stables	
Demie-vie	1 à 2,3 jours	2 à 5 jours	10 à 20 jours	21 jours	Origine murine : 0,7 à 1,6 jours	4 heures	1 heure	Quelques heures
Élimination	Foie	Foie	Foie	Foie	Foie	Rein	Rein	foie

5. Le radionucléide

L'utilisation d'anticorps radiomarqués en médecine nucléaire a permis de vectoriser spécifiquement divers radionucléides vers des cibles spécifiques. Suivant les caractéristiques physiques du radionucléide sélectionné, les anticorps radiomarqués ont un usage diagnostique (immunoscintigraphie) ou un usage thérapeutique (RIT). Le choix du radionucléide le plus adapté se fait sur des caractères physiques comme la demi-vie, le type d'émission, l'énergie du rayonnement ainsi que la stabilité chimique du couplage entre le radionucléide et le vecteur [25].

a. Isotopes utilisés pour l'imagerie

Dans le cas de l'immunoscintigraphie SPECT (*Single Photon Emission Computed Tomography*), la radiopharmacie a recours à des émetteurs de photons γ . Pour des raisons de dosimétrie, le choix des radionucléides s'est porté vers des isotopes émetteurs purs de rayonnement γ . Ce type de rayonnement électromagnétique est très pénétrant et ne dépose dans le corps du patient qu'une faible fraction de son énergie. Les isotopes d'intérêt (Tableau 4) ont la caractéristique d'avoir une demi-vie physique suffisamment longue pour être compatible avec la pharmacocinétique du vecteur et suffisamment courte pour ne pas poser de problème de dosimétrie.

Tableau 4 : Radionucléides d'intérêt en immunoscintigraphie [26].

Radionucléide	Demi-vie	Énergie γ (keV)	Intensité (%)
^{99m}Tc	6 heures	140	89
^{111}In	2,8 jours	171 245	90 94
^{123}I	13,3 heures	159 529	83 1,4

Dans le cas de l'imagerie par Tomographie d'Emission de Positron (TEP), la radiopharmacie a recours à des émetteurs de positons β^+ . Ce type de rayonnement particulaire s'annihile en présence d'un électron et engendre la formation de deux photons détectables permettant la construction d'une image. Cette technique dite « ImmunoTEP » a recours à des émetteurs de positons (Tableau 5) dont la demi-vie est compatible avec la pharmacocinétique de l'immunovecteur.

Tableau 5 : Emetteurs de positons utilisables en immunoTEP [26].

Radionucléide	Demi-vie (heures)	Énergie max. β^+ (MeV)	Énergie γ (keV)	Utilisation
^{44m}Sc	3,9	1,47	1157	TEP
^{64}Cu	12,7	0,65	/	TEP
^{86}Y	14,7	3,14	443 - 628 - 1077	TEP
^{124}I	100,8	2,14	602 - 723 - 1691	TEP

L'intérêt de cette technique « ImmunoTEP » est de coupler la spécificité de l'anticorps pour son antigène et la très bonne résolution spatiale de la TEP afin de donner au clinicien des images fonctionnelles diagnostiques de haute qualité [27].

b. Isotopes utilisés en thérapeutique

Les émetteurs de particules β^- , qui provoquent de nombreuses lésions biologiques sur des volumes faibles, sont apparus comme les plus adaptés à la RIT. Parmi les différents émetteurs β^- existants (Tableau 6), ceux présentant une demi-vie suffisamment longue pour être compatible avec la pharmacocinétique d'un anticorps et suffisamment courte pour ne pas poser de problème en terme de radioprotection/dosimétrie se sont avérés les plus intéressants. Les émetteurs de β^- de haute énergie (2 MeV) comme l'yttrium-90 ou le rhénium-188 sont susceptibles de délivrer des doses radiotoxiques aux cellules situées à moins d'une dizaine de millimètres du lieu d'émission et ainsi d'irradier de petits nodules alors que les émetteurs β^- de plus faible énergie (de 500 keV à 1 MeV) comme l'iode-131 ou le samarium-153 permettent une irradiation plus adaptée de tumeurs dont la taille varie de 0,5 à 1 mm [14].

Tableau 6 : Radionucléide émetteurs β^- à potentiel thérapeutique [25, 26, 28]

Radionucléide	Demi-vie (Jours)	Énergie max. β^- (MeV)	Distance max. dans les tissus	Énergie γ associé (MeV)
^{32}P	14,3	1,71	8,7 mm	/
^{47}Sc	3,4	0,6	3,1 mm	0,159 (68%)
^{64}Cu	0,5	0,57	1,8 mm	0,511 (38%)
^{67}Cu	2,6	0,57	1,8 mm	0,184 (48%) 0,092 (23%)
^{89}Sr	50,5	1,46	8,0 mm	/
^{90}Y	2,7	2,27	12,0 mm	/
^{105}Rh	1,5	0,57	1,9 mm	0,319 (19%) 0,306 (5%)
^{111}Ag	7,5	1,05	4,8 mm	0,342 (6%)
^{131}I	8,0	0,81	2,0 mm	0,364 (81%)
^{149}Pm	2,2	1,07	5,0 mm	0,286 (3%)
^{153}Sm	1,9	0,8	3,0 mm	0,103 (29%)
^{166}Ho	1,1	1,6	6,0 mm	0,81 (6%)
^{177}Lu	6,7	0,5	1,5 mm	0,113 (6%) 0,208 (11%)
^{186}Re	3,8	1,07	5,0 mm	0,137 (9%)
^{188}Re	0,7	2,11	11,0 mm	0,155 (15%)

Parmi les émetteurs de particules β^- présentant un spectre d'émission énergétique continu, on distinguera une énergie maximale et une énergie moyenne. Les distances moyennes et maximales parcourues (fonction de l'énergie) sont intéressantes pour la détermination de deux paramètres dosimétriques. En effet, la dosimétrie délivrée à la tumeur est directement dépendante de la distance moyenne parcourue et la dosimétrie aux tissus sains (environnant la tumeur) est dépendante de la distance maximale parcourue. Dans tous les cas, la distance moyenne parcourue est supérieure à la taille d'une cellule et il apparaît que la fixation d'un anticorps radiomarqué sur une cellule irradiera aussi bien cette dernière que ses voisines. Ainsi, des cellules situées au centre d'une masse tumorale pourront être irradiée, via un mécanisme de « feux croisés » (Figure 18), par les cellules périphériques ayant fixées l'immunovecteur [29].

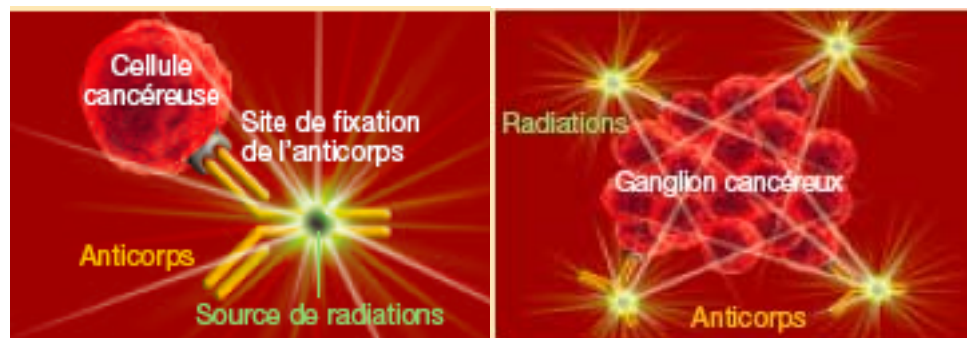


Figure 18 : Irradiation d'une cellule cancéreuse par un anticorps radiomarqué. A gauche, irradiation d'une cellule cancéreuse. A droite, irradiation d'un ganglion cancéreux par le mécanisme dit de feux croisés [30].

6. Couplage radionucléide-vecteur

Suivant la nature chimique (métal ou halogène) du radionucléide à coupler au vecteur, on distingue différentes voies de marquage selon que l'isotope radioactif est couplé directement à l'anticorps (voie directe) ou via un synthon organique (voie indirecte).

a. Immunocouplage des isotopes halogènes

Le marquage d'un anticorps dans le cadre de la radioimmunothérapie avec des radiohalogènes est surtout utilisé pour l'iode. Après oxydation sous une forme I^+ par divers agents (chloramine-T, iodogene, N-halosuccinimide,...). L'iode est susceptible de réagir directement à pH =7 par une substitution électrophile (Figure 19) sur les noyaux tyrosyles ou histidyles présents au niveaux de certains acides aminés des chaînes polypeptidiques [31, 32]. Un marquage réalisé en condition acide (pH=2), réalisable sur différents peptides permettra d'obtenir un marquage à l'iode uniquement sur les noyaux tyrosyles.

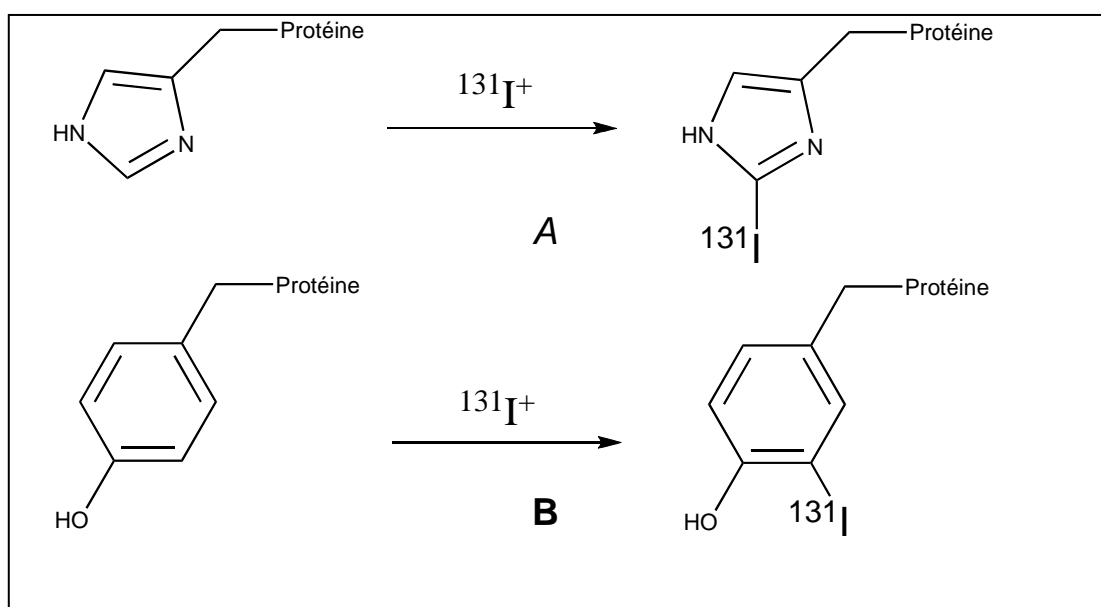


Figure 19 : Marquage direct d'un peptide à l'iode. A : iodation d'un noyau histidyl. B : iodation d'un noyau tyrosyl.

Lorsque les anticorps sont sensibles à des conditions oxydantes, que les noyaux tyrosyles ou histidyles sont inaccessibles, ou que le marquage direct s'avère instable *in vivo* la radioiodination par voie directe n'est plus réalisable. Afin de résoudre ce problème, il est possible d'utiliser des synthons organiques (groupements prosthétiques) qui possèdent, dans le cas des marquages à l'iode, un site d'iodation et un site d'ancrage au vecteur. Les principales fonctions utilisées pour ce couplage sont de type isothiocyanate ou N-hydroxysuccinimidyl (Figure 20) qui réagiront sur les groupes résiduels NH_2 ou SH présents au niveau des lysines et cystéines de la protéine.

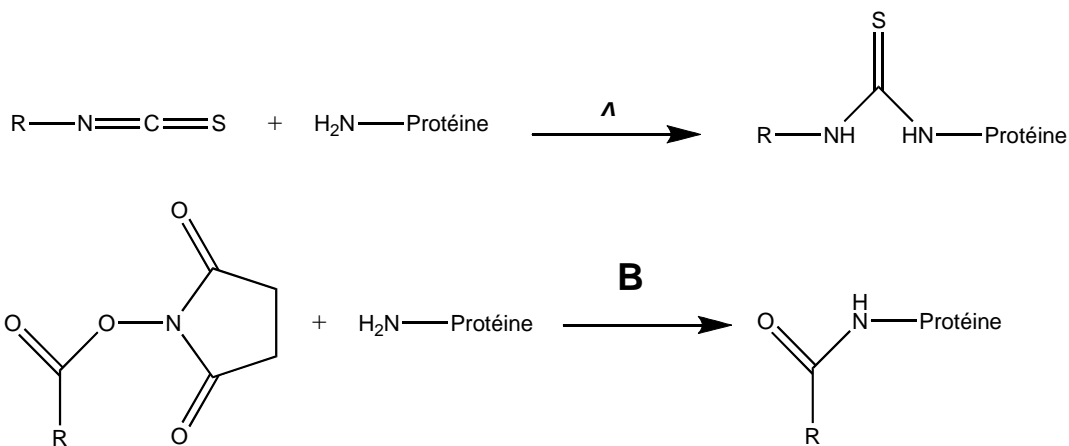


Figure 20 : Fixation d'un groupement prosthétique à un peptide. A : couplage d'une fonction isothiocyanate. B : couplage d'un ester activé de type N-hydroxysuccinimidyl.

L'iodation par voie indirecte est réalisée en deux temps. Dans un premier temps, l'iode est fixé au synthon prosthétique puis l'ensemble est couplé au vecteur dans un second temps.

Parmi les groupements les plus utilisés pour l'iode, on peut citer (Figure 21) : le réactif de Bolton-Hunter (iodation en position ortho de la fonction hydroxyl), les sels de diazonium (iodation par substitution nucléophile du triazène) et les organostanniques (iodation par substitution électrophile du groupement stannique) [32, 33].

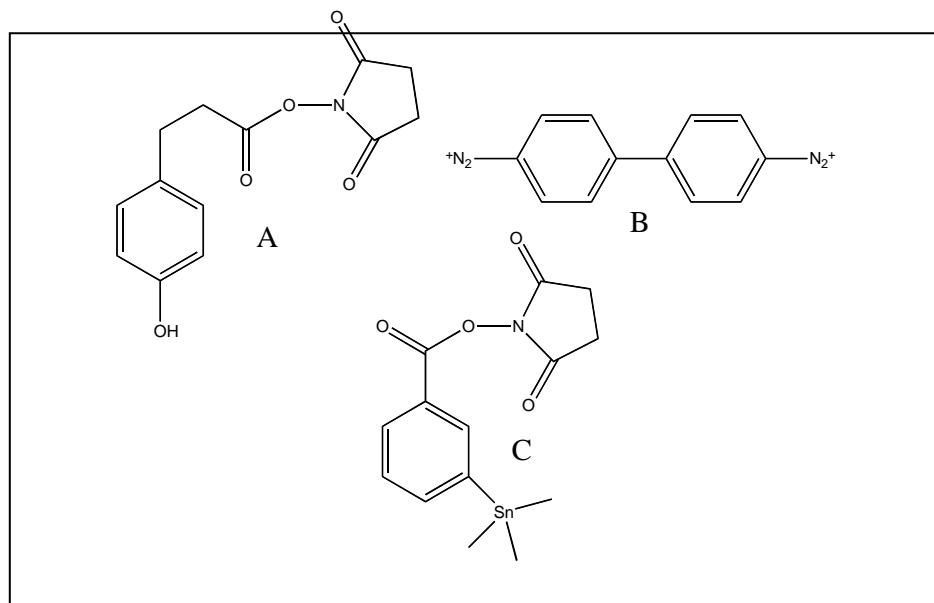


Figure 21 : Exemples de groupements prosthétiques utilisables pour une iodation. A) Réactif de Bolton-Hunter ; B) Sel de diazonium ; C) Précurseur triméthylstannyl

b. Immunocouplage des isotopes métalliques

Afin de réaliser le marquage d'un anticorps avec un radionucléide métallique, on couple un groupe prosthétique chélatant au vecteur (stratégie de l'immunoconjugué) et on pratique le radiomarquage dans un second temps. Dans ce type de marquage, le groupement prosthétique est constitué d'un agent chélatant bifonctionnel activé permettant d'une part sa liaison à la protéine et d'autre part la complexation du radionucléide d'intérêt. Les agents les plus souvent

rencontrés (Figure 22) sont des composés semi-rigides dérivés de l'acide diéthylène triamino pentaacétique (DTPA), des macrocycles polyaminocarboxyliques de type tetrazacyclododécane tetraacetic acid (DOTA) ou des composés de type diaminodithiols (N_2S_2) rencontrés dans la chimie du technétium.

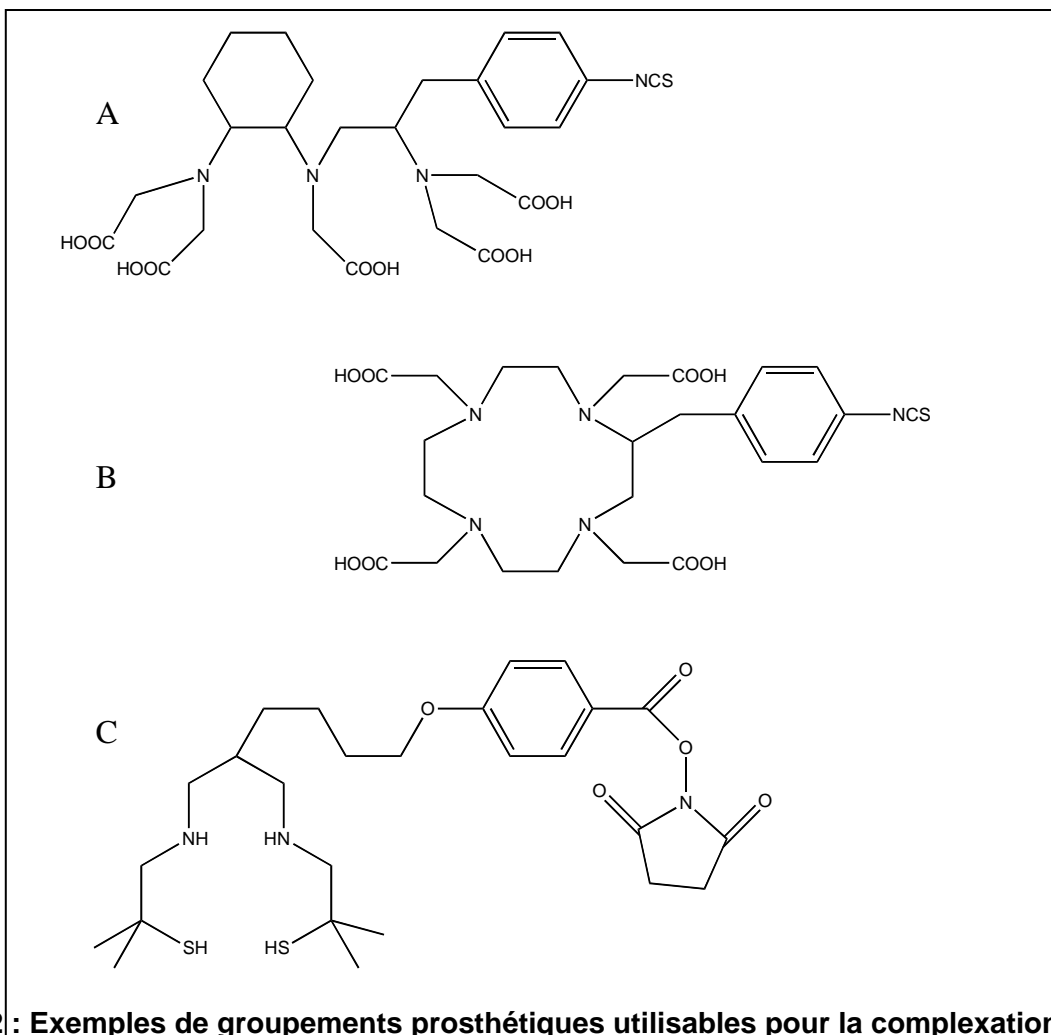


Figure 22 : Exemples de groupements prosthétiques utilisables pour la complexation des métaux. A) CHX-A''-DTPA ; B) pSCN-Bz-DOTA ; C) dérivé diaminodithiols.

II. INDICATIONS CLINIQUES DES IMMUNOVECTEURS

A. INDICATIONS DIAGNOSTIQUES

Le technétium-99m peut être couplé de façon directe à des anticorps au niveau des fonctions sulfhydriles (-SH) présentes après réduction des ponts disulfures [34]. Le LeukoScan[®] (Sulesomab), qui contient des fragments Fab'-SH d'anticorps monoclonaux antigranulocytes est aujourd'hui utilisé pour la détermination scintigraphique de la localisation et de l'étendue de l'infection/inflammation osseuse chez les patients suspectés d'être atteint d'ostéomyélite [35]. Par sa reconnaissance antigénique d'une glycoprotéine de surface (NCA-90) de granulocyte, le Sulesomab véhicule le technétium-99m sur le site infectieux. Le Scintimmun[®], qui est dirigé contre la glycoprotéine de surface NCA-95 des granulocytes, permet lui aussi, lorsqu'il est couplé au technétium-99m, le diagnostic d'ostéomyélite chronique post-traumatique [36].

L'utilisation de fragment F(ab')₂ anti- antigène carcino-embryonnaire (ACE) couplé au technétium-99m permet la visualisation de cancers colorectaux chez des souris ayant subi une xénogreffe de cancer du côlon humain [37]. L'indium-111 peut également être utilisé en immunoscintigraphie dans le cancer de la prostate (Prostascint[®]). Dans ce cas, le couplage à l'anticorps monoclonal s'effectue de façon indirecte [38].

B. INDICATIONS THERAPEUTIQUES

L'ensemble des données sur les caractéristiques tumorales montre que les cibles idéales pour la RIT β^- sont des tumeurs de petites tailles voire la maladie résiduelle métastatique. Parmi les pathologies d'origine cancéreuse, les hémopathies malignes sont des tumeurs radiosensibles se présentant sous la forme de petits amas cellulaires exprimant des antigènes caractéristiques et sont par conséquent une cible d'intérêt pour la RIT. Aux USA, la *Food & Drug Administration* (FDA) a donné son accord en 2003 pour la mise sur le marché d'un anticorps dirigé contre une phosphoprotéine situé à la surface des lymphocytes : le CD20. Cet anticorps, le tositumomab (Bexxar[®]) marqué à l'iode 131, a donné lors des études cliniques des résultats satisfaisants (Tableau 7) [39] dans les formes réfractaires et résistantes de lymphomes malins non-Hodgkiniens.

Tableau 7 : efficacité du traitement chez des patients à lymphome réfractaire/récidivant après chimiothérapie.

Numéro de l'étude (effectif)	Réponse globale		Réponse complète	
	Taux de réponse (%)	Durée médiane de la réponse (mois)	Taux de réponse (%)	Durée médiane de la réponse (mois)
RIT-II-004 (n=60)	47 %	11,7	20 %	47,2
CP-97-012 (n=40)	68 %	16,1	33 %	NA
RIT-I-000 ^b (n=22)	64 %	15,5	41 %	36,5
RIT-II-001 (n=47)	49 %	12,6	26 %	58,4
RIT-II-002 (n=61 ^a)	59 %	13,2	36 %	NA

a- patients recevant du ¹³¹I-tositumomab (permutation des groupes A et B). Exclut les patients qui ont seulement reçu du tositumomab (groupe B).

b- Exclut 17 patients ayant un lymphome de grade intermédiaire ou élevé.

En France, l'anticorps anti-murine Ibritumomab tiuxetan (Zevalin[®]) marqué à l'yttrium-90, dirigé contre la protéine CD20, a obtenu l'AMM en 2004 et présente une supériorité des taux de réponses cliniques (80%) par rapport au rituximab qui est un anti-CD20 non radiomarqué (56%) [40].

Parmi les autres anticorps radiomarqués qui font actuellement l'objet d'évaluation clinique, on peut citer l'epratuzumab (hLL2), marqué à l'yttrium-90 qui est dirigé contre la protéine CD22, antigène surexprimé dans les lymphomes malins non-Hodgkiniens de bas grade [41] ainsi que l'anticorps B-B4 spécifique du syndécan 1 (CD138) marqué à l'iode-131 qui est dirigé contre un heparan sulfate exprimé sur les cellules tumorales de la totalité des patients atteints de myélome multiple [42].

Si les premiers résultats cliniques de la RIT β^- qui concernent les tumeurs hématologiques et en particulier les lymphomes malins non-Hodgkiniens ont été établis, les résultats sont nettement moins nets pour les tumeurs solides et l'intérêt de la RIT β^- dans ce cas reste à démontrer. Leur relative radiorésistance impose des doses tumoricides élevées et injectées de façon précoce lorsque le volume tumoral est encore restreint. Néanmoins des résultats encourageants ont été apportés par différentes techniques d'optimisation de cette méthodologie.

III. OPTIMISATION DE LA RIT

En fonction de la cible tumorale, la radiopharmacie pourra faire varier différents facteurs en modulant les paramètres que nous avons déjà mentionnés:

- augmentation de l'expression antigénique par injection de cytokine,
- augmentation de la perfusion tumorale par injection drogues vasoactives,
- choix d'un vecteur de petite taille pénétrant dans les couches tumorales profondes,
- choix d'un radionucléide (ou d'un cocktail de radionucléides) dont l'énergie est adaptée à la taille de la tumeur ciblée,
- choix d'un nucléide dont les caractéristiques physiques sont adaptées à la pharmacocinétique du vecteur,
- choix d'une méthode de couplage isotope-vecteur améliorant la stabilité *in vivo*.

L'ensemble des voies d'optimisation de la radio-immunothérapie a pour but commun d'augmenter la dose délivrée à la tumeur par rapport à la dose délivrée aux tissus sains. Le développement des techniques d'imagerie permet maintenant de réaliser une étude dosimétrique avant d'injecter le vecteur thérapeutique. En effet, la mise à disposition de couple d'isotope (comme par exemple l'yttrium-86 et l'yttrium-90) permet avec le même vecteur, de réaliser dans un premier temps une image immunoTEP (avec l'yttrium-86) permettant de calculer la dose nécessaire en vue d'une irradiation (avec l'yttrium-90) pour détruire la cellule.

Afin d'augmenter la dose délivrée aux cellules tumorales en amplifiant la dose cumulée à la tumeur tout en maintenant, voire en réduisant, la dose délivrée aux tissus sains. Des techniques d'amélioration de l'activité spécifique (nombre d'atomes de radionucléides fixés par molécule d'immunoglobuline) ou de ciblage multi-temps permettent d'optimiser ce compromis entre l'irradiation maximale des tumeurs et la dose radio-toxique aux tissus sains [14, 42].

A. AMELIORATION DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE

L'activité spécifique (AS) correspond à la quantité de radioactivité véhiculée par gramme d'anticorps. Cette quantité de radioactivité est directement liée au nombre d'atomes radioactifs. L'activité spécifique correspond donc à la proportion de vecteur radiomarqué sur la quantité totale de vecteur injecté. Par exemple, dans le cas du Zevalin[®], la trousse est composée de 3,2 mg d'anticorps (MM=150 kDa) et le couplage s'effectue avec 1500 MBq (40,5 mCi). Si l'on considère que le rendement de couplage est optimal (100%), on obtient une activité spécifique de 468,8 MBq/mg (12,7 mCi/mg). Pour l'yttrium-90 ($T_{1/2} = 64,1$ heures, $\lambda = 3.10^{-6} \text{ s}^{-1}$), 468,8 MBq correspondent $1,56.10^{14}$ atomes soit $2,6.10^{-10}$ moles d'isotopes fixés sur 1 mg d'anticorps qui représentent $6,7.10^{-9}$ moles. Pour une AS de 468,8 MBq/mg, l'anticorps ne pouvant lier qu'un seul atome d'yttrium, on obtient un ratio de seulement 4 anticorps marqués sur 100.

Ce rapport entre le nombre de vecteurs radiomarqués et le nombre de vecteurs « froids » (qui se lie également à l'antigène) n'étant pas un facteur favorisant de la RIT, l'idée est venue de fixer plusieurs isotopes sur le même anticorps et d'augmenter ainsi l'activité spécifique du radiopharmaceutique. Une méthode utilisant des anticorps couplés à des liposomes radiomarqués portant plusieurs atomes radioactifs est actuellement en cours d'évaluation au sein de l'unité INSERM U601. Dans cette stratégie, l'anticorps (vecteur) est

couplé à un liposome (Figure 23) portant à sa surface et en son centre (partie polaire) des molécules auxquelles sont fixées des radio-isotopes [43].

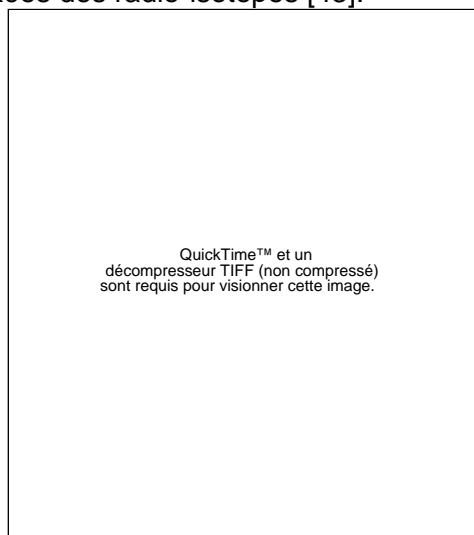


Figure 23 : Augmentation de l'AS par immunoliposomes. L'anticorps (A) transporte un liposome (B) qui irradie la tumeur avec des radioisotopes fixés en son centre (C) et/ou à sa surface (D)

B. STRATEGIE MULTI-TEMPS

Une autre voie d'optimisation de la RIT consiste à minimiser l'irradiation aux tissus sains en favorisant l'élimination du vecteur non fixé à la tumeur. Dans cette stratégie, l'immunovecteur (non radioactif) est injecté dans un premier temps et le radionucléide est injecté a posteriori.

1. Stratégie avidine-biotine en trois temps

Afin de minimiser l'irradiation des tissus sains, il est possible d'utiliser la forte affinité qui existe entre biotine et l'avidine. Pour ce faire, le patient est injectée dans un premier temps avec l'anticorps spécifique de l'antigène tumoral, l'anticorps est par ailleurs couplé à une molécule de biotine (Figure 24). Dans un second temps, on injecte de l'avidine, protéine qui présente quatre sites de liaisons à la biotine. L'avidine se fixe sur la biotine de l'anticorps fixé à la cellule tumorale. Pendant ce laps de temps, l'anticorps non fixé à la tumeur a été métabolisé et éliminé de l'organisme. Dans un troisième temps, on injecte de la biotine radiomarqué qui se fixera au complexe antigène-anticorps-biotine-avidine [14, 44]. De par son faible poids moléculaire, la biotine radiomarquée présente une meilleure pénétration intratumorale qu'un anticorps radiomarqué ainsi qu'une clairance plus rapide ce qui aboutit à une irradiation moindre des tissus sains [45].

	39
--	----

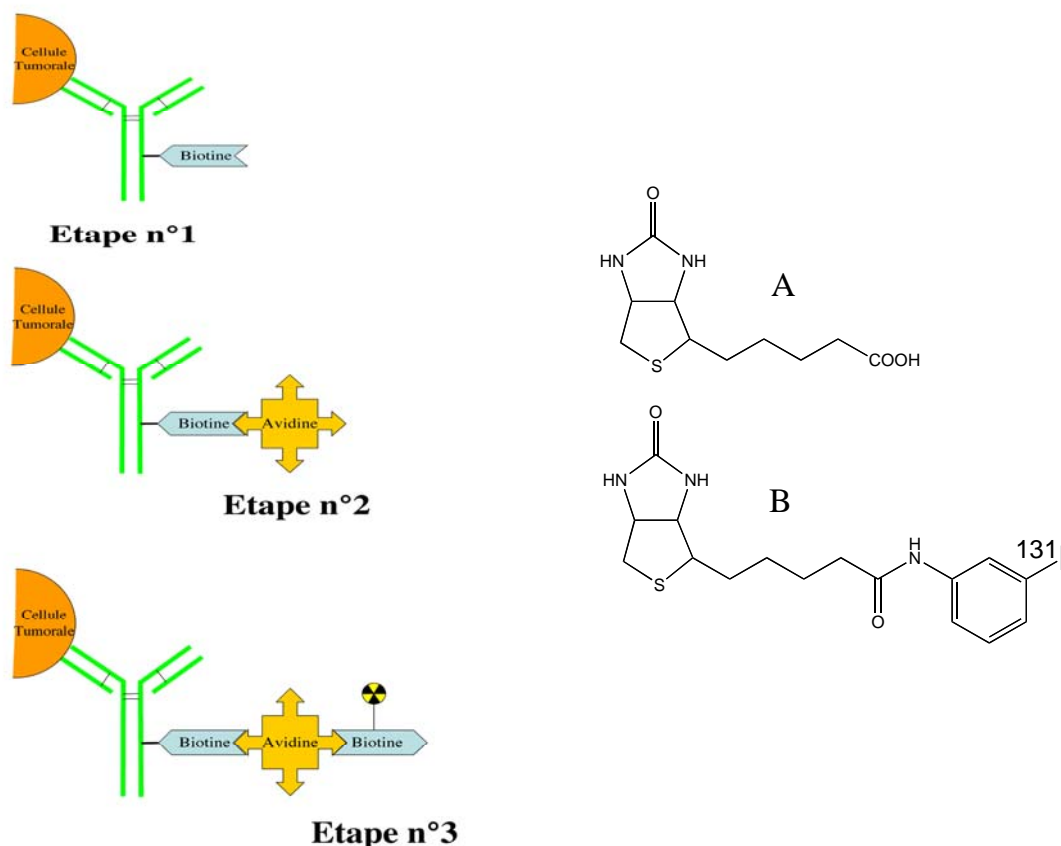


Figure 24 : A gauche : système 3 temps ; à droite, biotine (A) et Biotine marqué à l'iode-131 (B).

2. Stratégie « Affinity Enhancement System » en deux temps

Une autre stratégie d'optimisation de la RIT consiste à injecter dans un premier temps un anticorps bi-spécifique (Figure 25) dont un paratope reconnaît l'antigène tumoral et l'autre un haptène connu. Après un laps de temps suffisant (quelques jours) pour l'anticorps non fixé à la tumeur soit éliminé, on injecte dans un second temps, l'haptène d'intérêt radiomarqué qui se fixera à la cellule tumorale via l'anticorps bi-spécifique. Cette technique d'*Affinity Enhancement System* (AES) est actuellement en cours d'évaluation clinique dans le cancer médullaire de la thyroïde qui exprime fortement l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) [46]. Une dose d'anticorps bi-spécifique anti-ACE anti-DTPA-In est injectée. Après un délai de 5 jours, suffisant pour que les anticorps se soient fixés à la tumeur et que les anticorps non fixés soient éliminés de la circulation générale, l'haptène di-DTPA-TL-In marqué à l'iode 131 (Figure 25) est injecté et se dirige rapidement vers sa cible. L'haptène utilisé présente la caractéristique d'être bivalent ce qui permet un pontage entre deux anticorps prélocalisés augmentant d'autant plus la stabilité du complexe [40,45,48]. Les premiers résultats obtenus dans le cancer médullaire de la thyroïde sont très prometteurs avec un effet positif en termes de réduction de l'irradiation des tissus sains, donc de la toxicité hématologique.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 25 : Stratégie en 2 temps avec utilisation d'un anticorps bispécifique et d'un haptène radiomarqué (ex : haptène diDTPA-TL-In (A) radiomarqué à l'iode-131).

C. AMELIORATION DU TRANSFERT D'ENERGIE LINEIQUE (TEL)

Les rayonnements consécutifs à une désintégration β^- ont un TEL de l'ordre du keV/ μm ce qui est relativement faible et provoque une faible densité d'ionisation tout au long de leur parcours qui est de quelques millimètres dans les tissus mous. L'une des voies d'optimisation de la radio-immunothérapie consiste à utiliser des émetteurs de particules α qui présentent un rayon d'action court (de l'ordre de la centaine de micromètres) avec un TEL allant d'environ 40 à 100 keV/ μm [47]. Cette forte densité d'ionisation est donc plus adaptée au traitement de cancers diffus présentant de petites tailles comme les leucémies ou le myélome multiple ainsi que pour le traitement des micrométastases et de la maladie résiduelle. Le fort potentiel radiotoxique des particules α permet également de cibler des antigènes tumoraux faiblement exprimés (Figure 26). La partie expérimentale de ce mémoire se consacrera à cette nouvelle voie d'optimisation de la radio-immunothérapie.

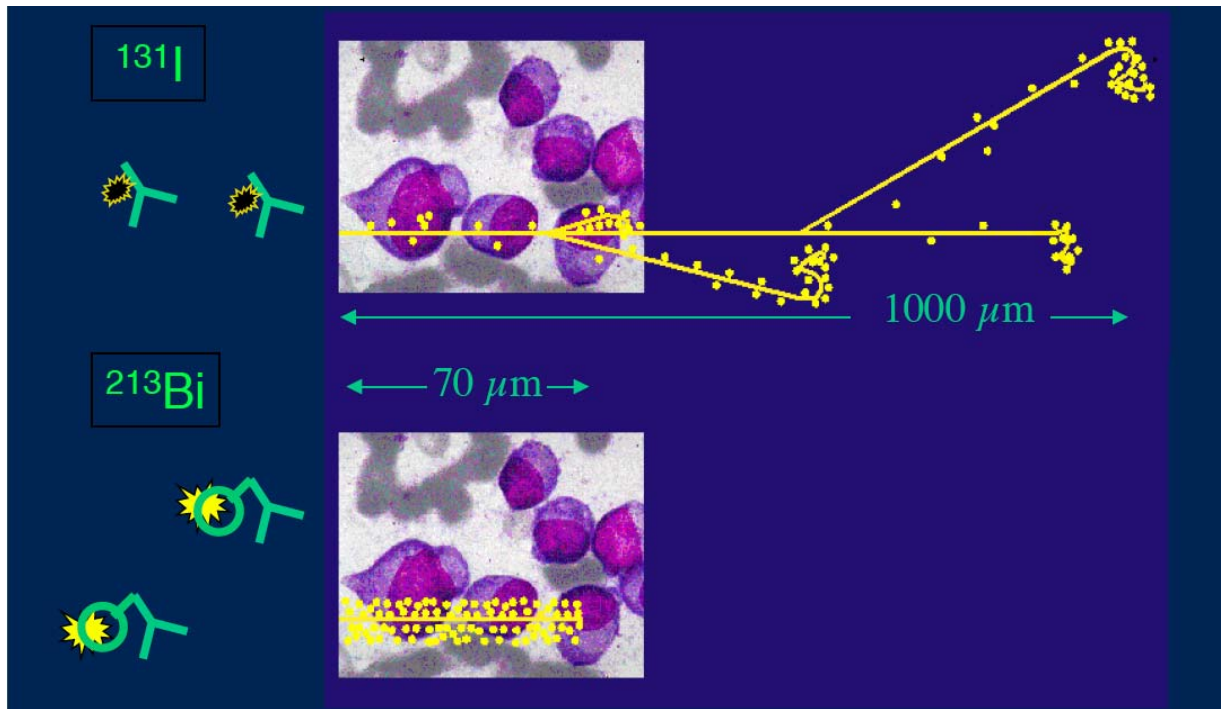


Figure 26 : Différence de trajet et de la densité d'ionisation entre l'iode-131 (émetteur β^-) et le bismuth-213 (émetteur α)

TROISIEME PARTIE : RADIO- IMMUNOTHERAPIE ALPHA

I. OBJECTIF DU TRAVAIL EXPERIMENTAL

Comme nous l'avons exposé précédemment la radio-immunothérapie est une méthodologie émergente d'intérêt dans l'arsenal thérapeutique anticancéreux. En effet, les premiers résultats obtenus avec des isotopes émetteurs β^- sont très encourageants dans le traitement des hémopathies malignes. Néanmoins, cette nouvelle méthodologie de traitement des cancers demande à être optimisée dans certains types de cancers, notamment pour ce qui concerne les cancers solides. Le but de ce travail est d'étudier la faisabilité de l'une de ces voies d'optimisation utilisant des isotopes émetteurs de particules α . Pour cela, nous avons répertorié les différents radionucléides pouvant présenter un intérêt pour la clinique puis, nous nous sommes intéressés à la logistique de production et à la radiochimie de ces radioéléments. Certains de ces isotopes ayant été mis à notre disposition, nous avons étudié la faisabilité du radiomarquage de vecteurs immunologiques.

II. ISOTOPES D'INTERET

On connaît plus de 100 radioisotopes émetteurs de particules α . Ce sont tous des éléments « lourds » ayant un numéro atomique supérieur à 82. La plupart de ces isotopes possèdent une demi-vie physique trop brève ou trop longue (uranium, polonium, plutonium,...) pour être compatible avec la RIT. Les quelques radionucléides qui présentent des caractéristiques favorables à une utilisation en RIT sont décrit ci-dessous (Tableau 8).

Radionucléide Fils	Demi-vie	Particule émise	%	Énergie	
²¹³ Bi	45,6 min.	α	2	6 MeV	
		β^-	98	444 keV	
		γ	17	440 keV	
	²¹³ Po	4,2 μ s	α	98	8 MeV
	²⁰⁹ Tl	2,2 min.	β^-	2	659 keV
²⁰⁹ Pb	3,25 h.	β^-	100	198 keV	
²⁰⁹ Bi	Stable				
²¹² Bi	60,6 min.	α	36	6 MeV	
		β^-	64	492 keV	
	298 ns	α	64	9 MeV	
		β^-	36	560 keV	
		γ	8	510 keV	
	3,05 min.	γ	31	580 keV	
		γ	36	2,6 MeV	
		γ			
²⁰⁸ Pb	Stable				
²¹¹ At	7,21 h.	α	42	6 MeV	
		γ	19	80 keV	
	²¹¹ Po	516 ms.	α	58	7,5 MeV
			γ	24	70 keV
	²⁰⁷ Bi	32 ans	α	41	570 keV
			γ	31	1 MeV
	²⁰⁷ Pb	Stable			
²²⁵ Ac	10 jours	α	100	6 MeV	
	²²¹ Fr	4,9 min	α	100	6 MeV
	²¹⁷ At	32,3 ms.	γ	10	218 keV
			α	100	7 MeV
²¹³ Bi	Cf. ²¹³ Bi				
²²³ Ra	11,4 jours	α	100	6 MeV	
		γ	40	80 keV	
		γ	14	270 keV	
		γ	100	7 MeV	
		α			
²¹² Pb	10,6 h.	cf. ²¹² Bi			

principaux isotopes émetteurs alpha et caractéristiques de désintégration.

A. MOYENS DE PRODUCTION DES ISOTOPES D'INTERET

1. Radium-223

Le radium-223 (^{223}Ra) est un produit de décroissance de l'uranium-231 (^{231}U) qui, après plusieurs décroissances successives, conduit à un isotope stable du plomb, le ^{207}Pb . (Annexe II). Des générateurs d'actinium-227 ont été conçus et permettent, par élution, d'obtenir du radium-223. [48]

La limite majeure de cet isotope est la quadruple émission alpha potentiellement radiotoxique pour les tissus sains ainsi que la présence de radon gazeux dans la chaîne de décroissance dont la biodistribution *in vivo* est inconnue. De par ses caractéristiques physiques, le radium-223 n'est pas le candidat idéal pour la RIT α .

2. Actinium-225 et Bismuth-213

L'actinium-225 (^{225}Ac) peut être obtenu à partir de la décroissance naturelle de l'uranium-233 (^{233}U) ou à partir du Radium-226 (^{226}Ra) par irradiation de neutron thermique (Annexe III). Les capacités thérapeutiques de l'actinium sont néanmoins limitées car cet isotope a la caractéristique d'émettre 4 particules alpha au cours de sa croissance ce qui induit, par la diversité chimique des isotopes fils, une très mauvaise stabilité du radiomarquage.

Le bismuth-213 (demi-vie = 46 minutes), ultime isotope émetteur alpha de la chaîne de décroissance de l'actinium-225 ne présente pas les inconvénients de ce dernier. Des générateurs où l'actinium-225 est fixé sur une résine échangeuse de cation de type AGMP 50 ont pu être créés. Ces générateurs permettent, en utilisant comme solvant d'élution un mélange d'iodure de sodium et d'acide chlorhydrique d'obtenir du bismuth-213 émetteur alpha sous la forme d'iodure de bismuth ($\text{BiI}_3/\text{BiI}_4^-$) utilisable en RIT [49].

3. Bismuth-212 et Plomb-212

Le Bismuth-212 (^{212}Bi) est obtenu par décroissance du thorium-228 (Annexe IV). Le thorium-228 est un déchet de l'industrie nucléaire civile et il existe aujourd'hui des générateurs où le thorium-228 est fixé sur une résine échangeuse d'ion de type Dowex 50 que l'on peut éluer. Selon la molarité de l'éluat en acide chlorhydrique, on peut décrocher spécifiquement le ^{212}Bi (HCl 0,5 N) ou son père, le ^{212}Pb (HCl 4 N) de la colonne. Ce mode d'élution permet d'utiliser spécifiquement l'un ou l'autre de ces isotopes en RIT.

4. Astate-211

L'astate-211 (^{211}At) est un produit cyclotron obtenu par la réaction nucléaire $^{209}\text{Bi}(\alpha,2n)^{211}\text{At}$ (Annexe V) sur une cible métallique enrichie en bismuth-209. Après irradiation de la cible, l'astate peut être extrait selon deux méthodes : soit par voie sèche, soit par voie humide.

a. Extraction par voie humide

Après attaque de la cible par de l'acide nitrique (« rectapur » à 69%), la solution métallique obtenue est extraite en milieu organique (diisopropylether). A un pH acide, seul l'astate est soluble en phase organique. L'astate est ensuite contre-extrait en phase aqueuse à pH alcalin par ajout d'hydroxylamine qui sera éliminé sous forme de nitrate après oxydation par du peroxyde d'hydrogène. La solution aqueuse d'astate sera amenée au volume désiré par évaporation et ajustée au bon pH par ajout de soude (Figure 27).

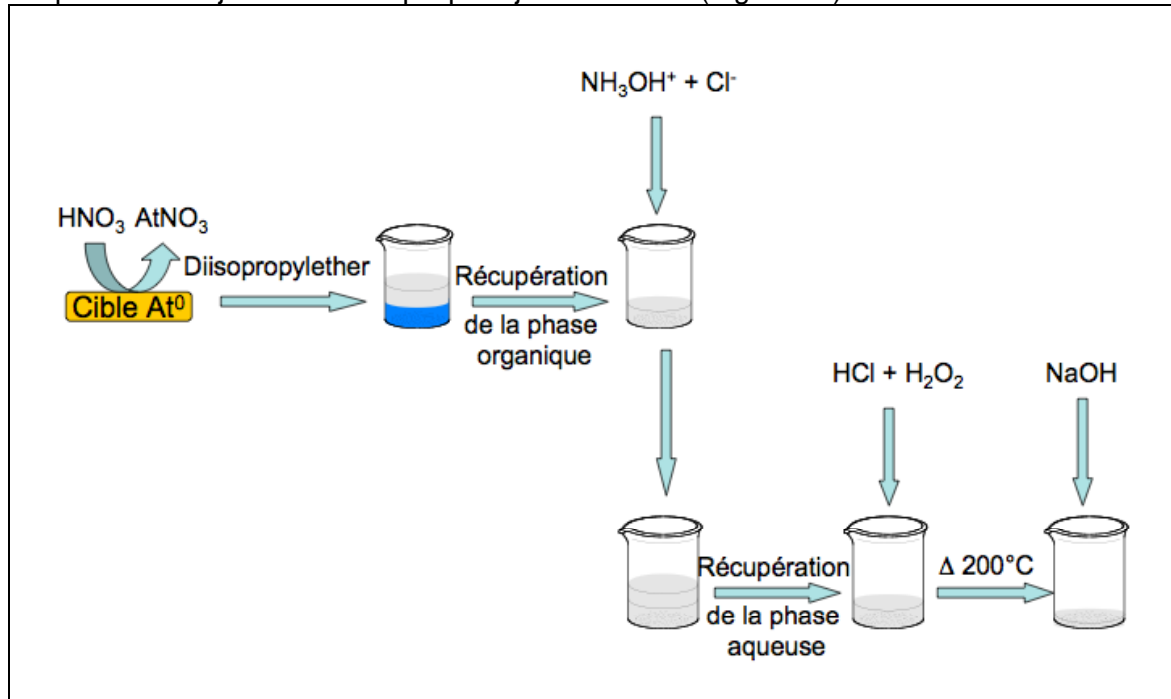


Figure 27 : Moyen d'obtention de l'astate-211 par la voie humide.

b. Extraction par voie sèche :

La cible est déposée dans un four chauffé à 650°C. L'astate étant le seul composé volatil à cette température, il passe à l'état gazeux puis est entraîné par un courant d'azote dans un tube capillaire refroidi dans un bain d'azote liquide. L'astate se condense alors sur les parois du capillaire et on le récupère par passage d'un volume de méthanol ou de soude 0,1M [50].

B. RADIOCHIMIE

Au cours de cette partie expérimentale, les différents contrats de collaboration de l'unité INSERM U601 ont permis d'obtenir certains de ces isotopes. Ce travail de thèse, m'a ainsi permis de travailler sur les isotopes du bismuth (212 et 213), du plomb-212 et de l'astate-211.

1. Bismuth

Le bismuth est le 83^{ème} élément de la classification périodique et présente une configuration électronique de type $[Xe] 4f^{14} 5d^{10} 6s^2 6p^3$. Ce métal, lorsqu'il est sous forme cationique (Bi^{3+}), a son orbitale 6p vide ce qui lui permet, grâce à des liaisons datives d'être complexé. Le bismuth sous son degré d'oxydation +III est considéré comme une base intermédiaire dans la classification de Pearson et présente une grande stabilité avec des ligands possédant des atomes avec des doublets non liants comme l'azote ou l'oxygène. Au sein de ses complexes, le bismuth présente un nombre de coordination variant de 3 à 10 [51].

Parmi les agents complexants les plus fréquemment rencontrés on retrouve des agents linéaires semi-rigides comme le CHX DTPA [52] ou macrocycliques comme le DOTA ou le PEPA [53] (Figure 28).

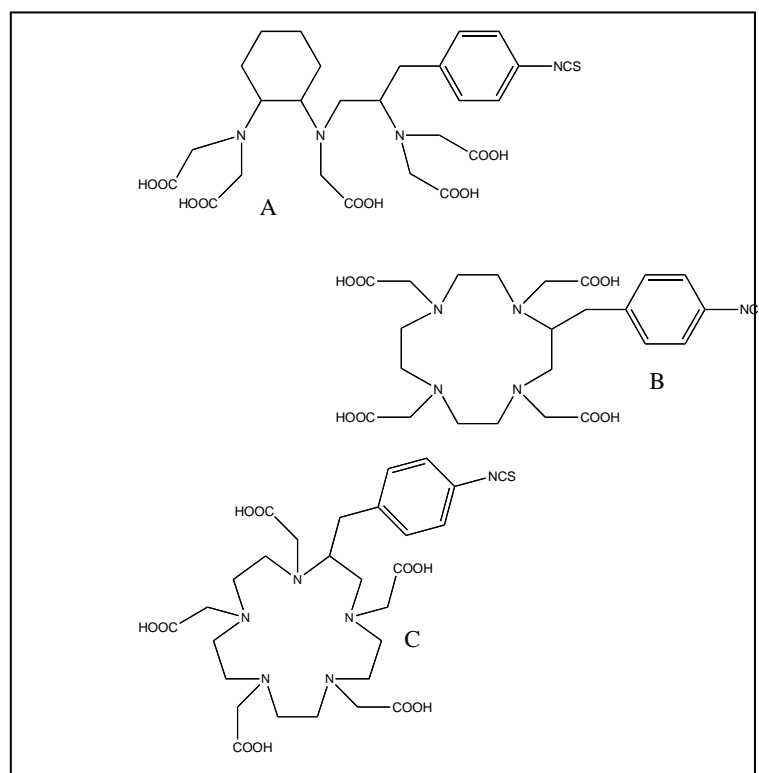


Figure 28 : Agent complexant d'intérêt pour le bismuth.

2. Plomb

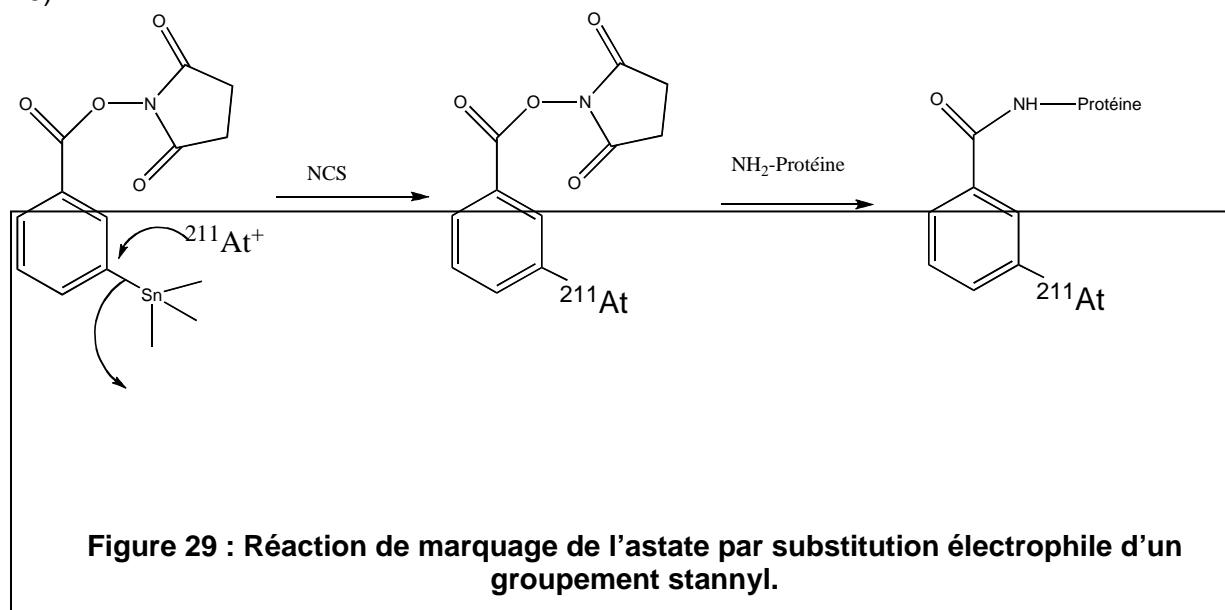
Le plomb est le 82^{ème} élément de la classification périodique et présente une configuration électronique de type $[Xe] 4f^{14} 5d^{10} 6s^2 6p^2$. Ce métal, lorsqu'il est sous forme cationique (Pb^{2+}) a son orbitale 6p vide et présente les mêmes caractéristiques de complexation

que le bismuth avec néanmoins, un rayon atomique légèrement supérieur. Les différents essais de radiomarquage réalisés dans la littérature ont été réalisés avec du DOTA (Figure 28). L'ensemble de ces essais ont démontré une instabilité du marquage lors de la décroissance du plomb-212 et d'autres agents complexants sont en cours de recherche.

3. Astate

L'astate est le 85^{ème} élément de la classification périodique et présente une configuration électronique de type $[Xe] 4f^{14} 5d^{10} 6s^2 6p^5$. Cet élément, découvert en 1940 par McKenzie, Segre et Corson [54], est le dernier des halogènes et sa chimie n'est qu'incomplètement connue puisque aucun isotope stable n'existe à l'état naturel.

D'une manière générale, la chimie de l'astate ressemble à celle de son homologue halogène de rang inférieur : l'iode. Au sein de la série halogène, on observe une diminution de l'énergie de liaison carbone-halogène inversement liée à l'augmentation de la masse atomique ($C-F > C-Cl > C-Br > C-I > C-At$). Cette diminution dans l'énergie de valence est de plus inversement proportionnelle à la longueur de la liaison carbone-halogène. Cette plus faible réactivité de l'astate par rapport à l'iode explique pourquoi il n'est pas possible de le fixer de manière directe à un résidu tyrosyl peptidique. La méthode la plus courante pour radiomarquer un vecteur immunologique est une méthode indirecte en deux étapes utilisant dans un premier temps la substitution électrophile d'un groupement partant de type trialkylstannyl par de l'astate préalablement oxydé par de la N-chlorosuccinimide sous une forme At^+ . Ce synthon bifonctionnel sera dans un second temps couplé, via une fonction ester activé de type N-hydroxysuccinimidyl, à une fonction amine présente sur un résidu lysine de la protéine (Figure 29).



II. ESSAI DE MARQUAGE

A. MATERIELS ET METHODES

1. Matières premières

Le générateur d'actinium-225, permettant l'obtention de bismuth-213, nous est fourni par l'Institut des transuraniens de Karlsruhe (Allemagne). Le générateur de thorium-228, permettant l'obtention de plomb-212 et de bismuth-212, nous est fourni par la société Areva (France) et, est utilisé en partenariat avec le laboratoire Subatech de l'école des Mines de Nantes. L'actinium-225 et le thorium-228 nous sont fournis dans un but de valorisation des déchets du nucléaire civil.

L'astate-211 est produit par le cyclotron CERi du CNRS d'Orléans et est extrait de la cible par l'école des Mines de Nantes.

Le [(R)-2-amino-3-(4-isothiocyanatophenyl)propyl]-trans-(S,S)-cyclohexane-1,2-diamine-pentaacetic acid (CHX-A''-DTPA) et le S-2-(4-isothiocyanatobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane tetraacetic acid (p-SCN-Bn-DOTA) sont des produits de la société Macrocyclics (Dallas, USA).

Les vecteurs (anticorps 7-D4 et 8-D4) sont préparés *in situ* par l'unité U601 de l'INSERM de Nantes. L'anticorps B-B4 nous a été fourni par Diaclone Research (Besançon, France). L'albumine sérique bovine et les composés chimiques ayant servi à la réalisation des tampons sont des produits Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne).

Les colonnes de purification PD-10 sur Sephadex G25[®] (chromatographie par gel exclusion) sont fournies par la société GE Healthcare (Uppsala, Suède).

2. Modification des anticorps

Afin de pouvoir fixer un radionucléide métallique à un vecteur de nature protéique, il est nécessaire de coupler ce dernier à un agent chélatant bifonctionnel permettant de complexer, de façon stable le radioélément. Les agents complexants utilisés dans cette partie expérimentale sont de type CHX-A''-DTPA et p-SCN-Bn-DOTA.

a. Réaction de couplage

Le CHX-A''-DTPA et le p-SCN-Bn-DOTA sont repris par de l'acide chlorhydrique 0,4 N afin d'obtenir une concentration finale de 15 $\mu\text{mol/mL}$. A 150 μL de la solution d'anticorps en tampon carbonate (Annexe VI) est ajouté 10 équivalents (8,33 μL) de CHX-A''-DTPA ou de p-SCN-Bn-DOTA. Le milieu réactionnel est mis à incuber à température ambiante pendant 24 heures.

b. Purification des vecteurs couplés

La réaction de couplage à l'immunovecteur se faisant avec un large excès d'agent chélatant, elle nécessite une étape de purification permettant d'éliminer cet excès. La séparation de l'immunovecteur (plusieurs milliers de daltons) de l'agent chélatant (quelques centaines de daltons) repose sur la chromatographie en gel d'exclusion. Une technique de chromatographie d'exclusion sur gel de type PD-10 est préférée à la technique de « Fast Protein Liquid Chromatography » qui, bien qu'elle permette de séparer les agrégats protéiques, relargue des contaminants métallique dans le milieu. Les colonnes de Sephadex G25[®] (PD-10) sont reconditionnées par un tampon acétate d'ammonium 0,1 mol/L pH = 5,6 (Annexe VI). La solution d'immunovecteur est déposée avec 1,5 mL de tampon acétate. Par la suite, toutes les fractions de 500 µL sont récupérées. Les fractions d'intérêts sont déterminées par absorbance UV à 280 nm puis réunies. La concentration en immunovecteur obtenue est mesurée par spectrométrie UV à 280 nm où le coefficient d'extinction molaire (ϵ_m) d'un anticorps est de $2,1 \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

c. Calcul du nombre de ligands par vecteur

Afin de déterminer le nombre d'agent complexant fixés par molécule de vecteur, un test de couplage à l'indium est réalisé. L'indium réagissant mole à mole avec l'agent complexant, une solution de molarité connue en indium est additionnée de traces radioactives d'indium-111. Cette solution traçante dite « avec entraîneur » nous permet, via la stoechiométrie de la réaction de déterminer le nombre moyen de ligand par immunovecteur.

Une solution de chlorure d'indium (III) à $9,53 \mu\text{mol/mL}$ est préparée en dissolvant 32,1 mg de chlorure d'indium (III) dans 15,2 mL d'acide chlorhydrique à 0,06 mol/L.

A $10 \mu\text{L}$ de cette solution de chlorure d'indium non radioactif est ajouté $10 \mu\text{L}$ d'une solution de chlorure d'indium-111 émetteur de rayonnement gamma. La solution radioactive étant quantitativement à l'état de « trace », on peut considérer que la solution finale d'indium avec entraîneur est à $4,77 \mu\text{mol/mL}$.

Une quantité connue de vecteurs couplés préalablement avec le CHX-A''-DTPA ou avec le p-SCN-Bn-DOTA est mise à incuber pendant 1 heure à 45°C avec 4 équivalents de la solution d'indium. Le rendement de marquage est déterminé par chromatographie de couche mince sur gel de silice (ITLC-SG) en tampon citrate pH=5,3 révélée au Phosphor-Imager. Le nombre de ligands par vecteur est donné en multipliant le nombre d'équivalents en indium par le rendement de couplage.

La détermination de ce nombre de ligand par vecteur nous permet d'estimer l'activité spécifique (rapport entre le nombre d'anticorps radiomarqués et le nombre d'anticorps non-radiomarqués) de l'immunovecteur après radiomarquage.

3. Radiomarquage de vecteurs au bismuth-213, bismuth-212 et plomb-212.

De façon optimisée, le bismuth-213 est décroché du générateur ^{225}Ac - ^{213}Bi par 1 mL de mélange NaI 0,1 mol/L et HCl 0,1 mol/L. Cette technique nous permet d'obtenir des rendements d'élution de 60 à 80 %.

L'élution du générateur ^{228}Th - ^{212}Bi par 5 mL d'HCl 0,5 mol/L nous permet d'obtenir du bismuth-212 avec un rendement d'élution de l'ordre de 90%.

L'élution du générateur ^{228}Th - ^{212}Pb par 5 mL d'HCl 4 mol/L nous permet d'obtenir du plomb-212 avec un rendement d'élution de l'ordre de 90%.

Le radiomarquage par des isotopes de nature métallique requiert des conditions acides afin d'éviter la précipitation par hydrolyse des métaux. Les différentes solutions d'élution obtenue sont neutralisée par un ajout de soude et tamponnée par un tampon citrate/acétate pH= 5,6 (Annexe VI). Les marquages au bismuth-213 ont été effectués au sein de l'unité U601 de l'INSERM et les marquages au plomb-212 et au bismuth-212 ont été réalisés au laboratoire Subatech de l'Ecole des Mines de Nantes.

Les différentes conditions de marquage de ces différents isotopes sont répertoriées ci-dessous (Tableau 9) :

Tableau 9 : Radiomarquage avec le bismuth-213, le bismuth-212 et le plomb-212.

Isotopes	V d'éluat	V Tp citrate-acétate (Annexe VI)	V NaOH	Vecteur	Tps et T°C d'incubation
Bismuth-213 en HCl 0,1 mol/L	1 mL	100 µL	40 µL NaOH 2,5 mol/L	20 – 600 µg d'anticorps (B-B4, 7-D4 ou 8-D4) – CHX-A''-DTPA	15 min. 37°C
Bismuth-212 en HCl 0,5 mol/L	1,5 mL	150 µL	150 µL de NaOH 5 mol/L	20 µg de sérum albumine bovine – CHX-A''-DTPA	20 min. Temp. Ambiante
Plomb-212 en HCl 4 mol/L	1,5 mL	500 µL	1,2 mL de NaOH 5 mol/L	20 µg de sérum albumine bovine – CHX-A''-DTPA ou p-SCN-DOTA	20 min. Temp. Ambiante

Le rendement de couplage de ces différents marquages est calculé par chromatographie de couche mince sur gel de silice (ITLC-SG) en tampon citrate pH= 5,3 (Annexe VI) puis compté au scintillateur solide pour le bismuth-213 ou au phosphor-imager pour le bismuth-212 et le plomb-212.

Une colonne de purification sur gel d'exclusion stérique (PD-10) est reconditionnée puis éluee, après dépôt du mélange réactionnel, par un mélange de sérum albumine bovine (0,25 g) dans 50 mL de tampon phosphate 0,1 mol/L pH = 7,2 (Annexe VI). Les différentes fractions sont collectées et mesurées au débit-mètres. Les fractions d'intérêt sont réunies et la pureté radiochimique est contrôlée par chromatographie de couche mince sur gel de silice (ITLC-SG) en tampon citrate pH=5,3. La pureté radiochimique est calculée par ITLC-SG réalisée en tampon citrate est découpée à mi-hauteur de migration et les deux parties sont mesurées à l'aide d'un compteur à cristal de NaI(Tl).

4. Radiomarquage d'un vecteur (BSA) à l'astate-211

Le radiomarquage d'une protéine par de l'astate-211 a été optimisé à l'aide de marquage à l'iode-125 dont la réactivité est similaire. Ces différentes études ont été menées en substituant de façon électrophile un précurseur stannique par de l'iode oxydé par de la N-chlorosuccinimide. Ces différents essais ont permis de mettre au point une technique de radiomarquage utilisant 20 nmol de précurseur stannique et 5 équivalents (100 nmol) de N-

chlorosuccinimide. Dans ces conditions, les rendements de radiomarquages sont d'environ 100 % mais le large excès de précurseur stannique n'ayant pas réagi avec le radionucléide (présent à l'état de trace) nécessite une étape d'optimisation afin de limiter le précurseur stannique pouvant se lier au vecteur protéique.

a. 1^{ère} étape : Radiomarquage du synthon à l'astate-211

Afin d'optimiser le marquage du précurseur stannique à l'astate-211, une étude visant à réduire la quantité de précurseur et d'oxydant a été menée.

- 100 μ L d'une solution-mère de N-hydroxysuccinimidyl de 3-trimethylstannylbenzoate à 18,1 mmol/L en dichlorométhane sont évaporés à sec et repris par 1 mL d'un mélange méthanol/acide acétique (95 :5, v/v). Des dilutions au dixième de cette solution mère à 1,81 mmol/L en méthanol/acide acétique (95 :5, v/v) sont préparées.

- Une solution d'acide 3-trimethylstannylbenzoïque à 1,8 mmol/L en méthanol/acide acétique (95 :5, v/v) servant de témoin à l'ester hydrolysé est préparé.

- 24,5 mg de N-chlorosuccinimidine (MM = 133,53 g/mol) sont repris par 20,2 mL d'un mélange méthanol/acide acétique (95 :5, v/v). Des dilutions au dixième de cette solution mère à 9,1 mmol/L en méthanol/acide acétique (95 :5, v/v) sont préparées.

L'astate est extrait de sa cible par la voie humide (attaque par l'acide nitrique et extraction par le diisopropylether). La solution organique obtenue présente une activité volumique de l'ordre de 40 MBq/mL. Aux 100 μ L de cette solution diisopropylether est ajoutée une quantité variable de la solution de N-chlorosuccinimidine à 9,1 mmol/L et une quantité variable de la solution de N-hydroxysuccinimidyl de 3-trimethylstannylbenzoate à 1,8 mmol/L. Cette solution est mise à incuber à température ambiante pendant 30 minutes. Le marquage de l'acide 3-trimethylstannylbenzoïque servant de témoin est réalisé avec 100 μ L de la solution diisopropylether d'astate-211, 11 μ L de la solution de témoin et 11 μ L de la solution de N-chlorosuccinimide à 9,1 mmol/L (Figure 30).

Le rendement de couplage de l'astate sur le synthon (ester activé ou témoin acide) est déterminé par chromatographie de couche mince sur silice avec un mélange chloroforme/acétate d'éthyle (5 :5 v/v) révélée au phosphor-imager. Des références sont obtenues par un marquage, dans les mêmes conditions avec de l'iode-125.

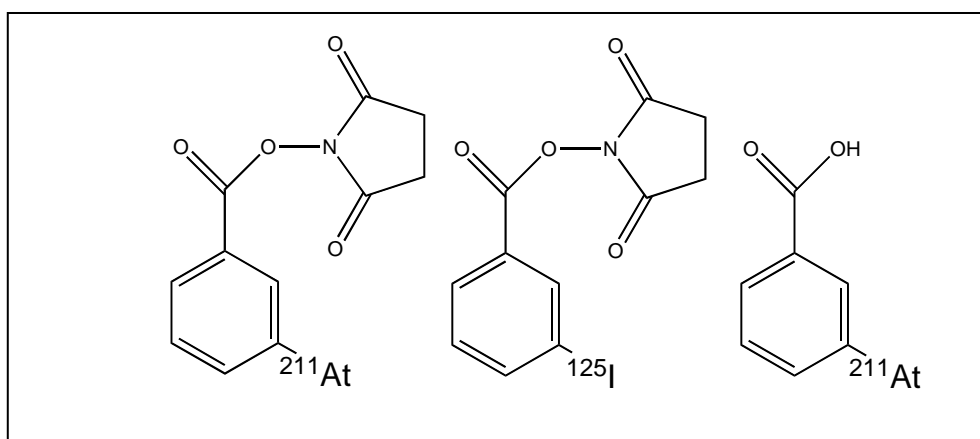


Figure 30 : Différentes molécules testées : N-hydroxysuccinimidyl d'astatobenzoate (à gauche), N-hydroxysuccinimidyl de iodobenzoate (au centre) et acide astatobenzoïque (à droite).

Purification sur HPLC

Les conditions optimales de marquage requerrant un large excès de précurseur stannique, une technique HPLC permettant d'éliminer cet excès à été mise au point. Les synthons radiomarqués sont purifiés par HPLC sur colonne Waters μ bondapak C₁₈ (3.9 x 300 mm ; 5 μ m) avec une phase mobile allant, en gradient, d'un mélange eau TFA 0,1%/methanol 8:2 à un mélange (après 30 minutes) eau TFA 0,1%/methanol 2:8 avec un débit de 1 mL/min.

Purification sur colonne SepPak C₁₈

La mise en place d'une technique alternative de purification sur colonne SepPak C₁₈ a permis un gain de temps et une possibilité d'automatisation de la purification. La solution de marquage (réalisée dans les meilleures conditions de rendement) est évaporée à sec puis reprise par un mélange TFA 0,1%/methanol 8:2. Cette solution est déposée sur une colonne SepPak C₁₈ préalablement conditionnée en eau TFA 0,1%. La colonne est ensuite éluée par passage de 4 mL d'eau TFA 0,1% puis par fraction de 1 mL de mélange eau TFA 0,1%/Methanol 5:5.

b. 2ème étape : Couplage du synthon à une protéine

15 mg d'albumine sérique bovine sont repris par 3 mL d'un tampon carbonate 50 mmol/L pH = 8,6 (Annexe VI). 100 μ L de cette solution de couplage sont ajoutés aux fractions de purification d'intérêt préalablement évaporées à sec. Cette solution est mise à incuber à température ambiante pendant 30 minutes. Le rendement de couplage synthon-peptide est estimé par chromatographie de couche mince sur gel de silice (ITLC-SG) en tampon citrate pH=5,3 (Annexe VI) révélée au phosphor-imager.

Une colonne de purification sur gel d'exclusion stérique (PD-10) est reconditionnée puis éluée, après dépôt du mélange réactionnel, par un tampon phosphate 0,1 mol/L pH = 7,2 (Annexe VI). Les différentes fractions sont mesurées à l'aide d'un scintillateur solide de type cristal de NaI(Tl). Les fractions d'intérêt sont réunies et la pureté radiochimique est estimée par chromatographie de couche mince sur gel de silice (ITLC-SG) en tampon citrate pH=5,3 (Annexe VI) révélée au phosphor-imager.

B. RESULTATS

1. *Couplages des vecteurs aux complexants de types p-SCN Bn-DOTA et CHX-A''-DTPA.*

Les protéines, purifiées par gel-filtration (Figure 31) à l'aide d'une colonne Sephadex® G25 (PD-10) possèdent un volume d'éluion de 3,5 à 5 mL et les molécules de poids moléculaires inférieurs à 10 000 Da de 7 mL. Le pic chromatographique des protéines a été récupéré sous un volume de 1,5 à 2 mL selon les conditions expérimentales.

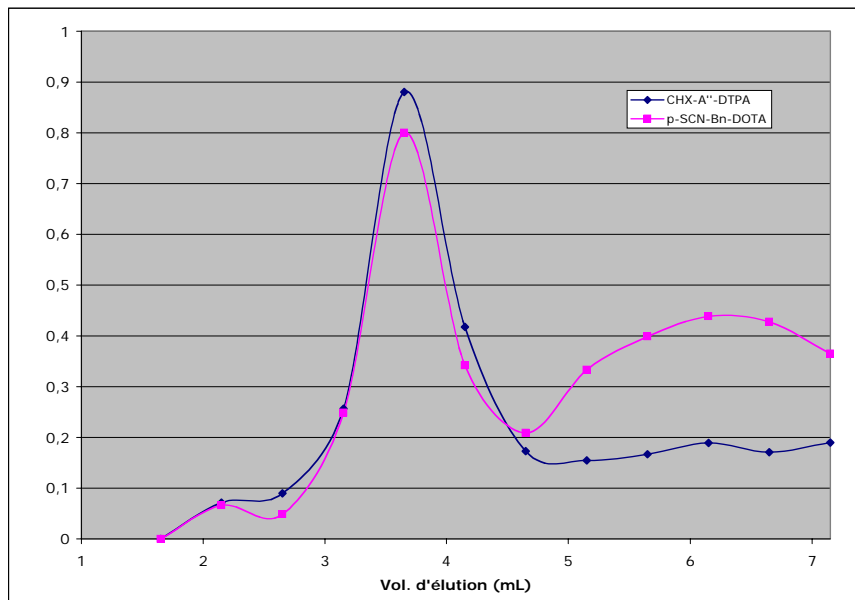


Figure 31 : Profil d'élution sur Sephadex® G25 de protéines couplées au CHX-A''-DTPA (bleu) et au p-SCN-Bn-DOTA (rose).

L'absorbance des fractions réunies mesurées à 280 nm afin d'estimer la concentration en vecteur est de 0,477 pour le p-SCN-Bn-DOTA et 0,412 pour le CHX-A''-DTPA. Les concentrations correspondantes sont de 2,3 $\mu\text{mol/L}$ et 2,0 $\mu\text{mol/L}$ respectivement ($\epsilon_m = 2,1 \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Le test à l'indium-111 avec entraîneur révélé au phosphor-Imager (Figure 32) a donné des rendements moyens de couplage de 40 % pour le p-SCN-Bn-DOTA et 50 % pour le CHX-A''-DTPA. Les rendements de couplage correspondant sont de 1,5 et 2,0 ligands par anticorps respectivement.

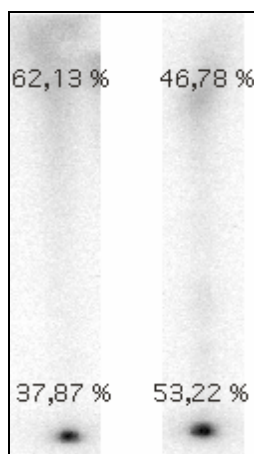


Figure 32 : Image obtenue au phosphor-imager d'ITLC-SG en tempou citrate pH=5,3. Le p-SCN-Bn-DOTA (à droite) présente 37,9 % de fixation et le CHX-A''-DTPA (à gauche), 53,2 %.

2. Marquage d'anticorps au Bismuth-213.

Les résultats des différents marquages d'anticorps couplés au CHX-A''-DTPA avec du bismuth-213 sont récapitulés ci-dessous (tableau 10) :

Tableau 10: Résultats des marquages au bismuth-213, les intervalles de confiance notés avec les moyennes sont estimés avec un risque = 0,05. PRC : Pureté Radiochimique, AS : Activité Spécifique.

Quantité d'anticorps	Rendements	Temps nécessaire	PRC	AS (mCi/mg)
100 µg	69,7 %	45 minutes	95,6 %	12,0
50 µg	77,4 %	40 minutes	97,0 %	17,4
100 µg	72,8 %	48 minutes	97,2 %	8,6
50 µg	79,6 %	44 minutes	96,7 %	21,6
300 µg	96,0 %	46 minutes	99,7 %	7,3
300 µg	93,1 %	40 minutes	99,8 %	4,5
600 µg	66,5 %	41 minutes	97,7 %	2,9
60 µg	85,2 %	40 minutes	99,7 %	37,9
100 µg	94,3 %	44 minutes	99,2 %	21,4
30 µg	90,7 %	48 minutes	99,8 %	27,2
20 µg	89,2%	46 minutes	99,6 %	45,8
Moyennes	83,1 +/- 5,9 %	43,8 +/- 1,8 min	98,4 +/- 0,9 %	

3. Marquage au bismuth-212

Dans les conditions d'ITLC-SG utilisées, l'anticorps ne migre pas ($R_f=0$) alors que le bismuth non lié migre avec le front de solvant ($R_f=1$).

Les rendements de marquage obtenus dans les conditions sont de l'ordre de 80%. Il est à noter que l'activité du générateur de bismuth-212 est trop faible pour avoir une statistique de comptage donnant plus de précision.

Les protéines, purifiées par gel-filtration (Figure 33) à l'aide d'une colonne Sephadex® G25 (PD-10) possèdent un volume d'élution de 3,5 à 5 mL et les molécules de poids moléculaires inférieurs à 10 000 Da de 7 mL. Le pic chromatographique des protéines a été récupéré sous un volume de 1,5 à 2 mL selon les conditions expérimentales.

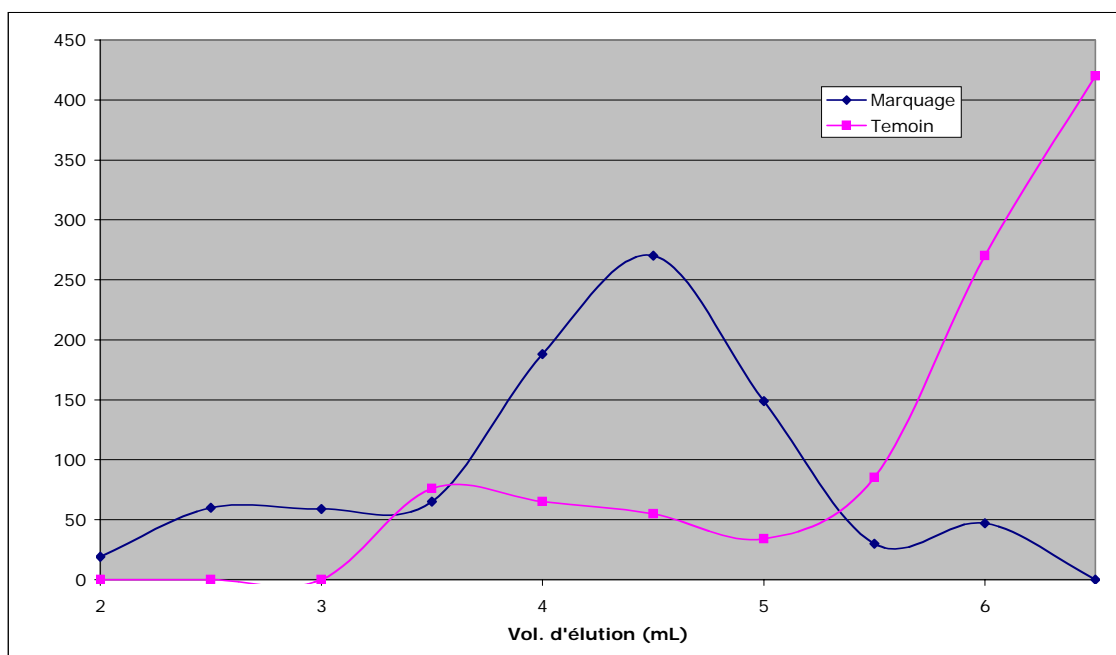


Figure 33 : : Profil d'élution sur Sephadex® G25 d'anticorps couplés au bismuth-212 (bleu) et du témoin bismuth-212 libre (rose).

4. Marquage au plomb-212

Dans les conditions d'ITLC-SG utilisées, l'anticorps ne migre pas ($R_f=0$) alors que le plomb non lié migre avec le front de solvant ($R_f=1$).

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure ci-dessous (Figure 34).

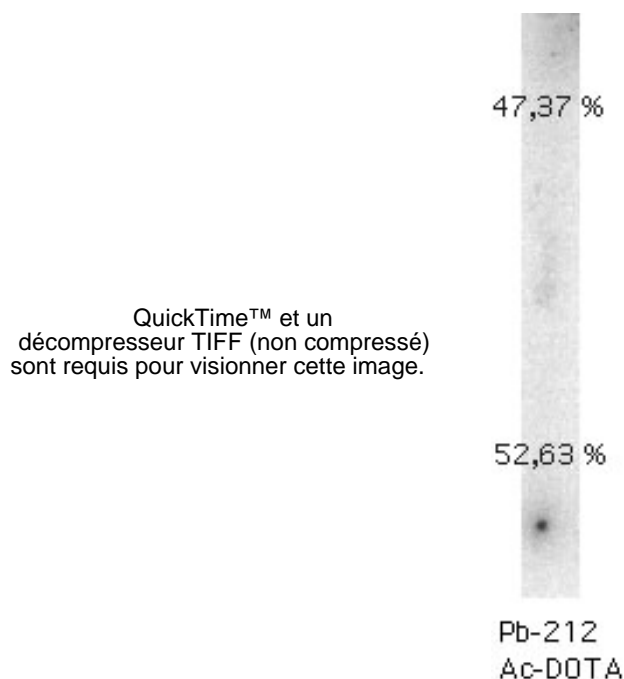


Figure 34 : ITLC-SG en tampon citrate du plomb libre (à gauche) de l'anticorps-CHX-A''-DTPA marqué au plomb (au centre) et de l'anticorps-DOTA marqué au plomb (à gauche).

Les protéines, purifiées par gel-filtration (Figure 35) à l'aide d'une colonne Sephadex® G25 (PD-10) possèdent un volume d'éluion de 3,5 à 5 mL et les molécules de poids moléculaires inférieurs à 10 000 Da de 7 mL. Le pic chromatographique des protéines a été récupéré sous un volume de 1,5 à 2 mL selon les conditions expérimentales.

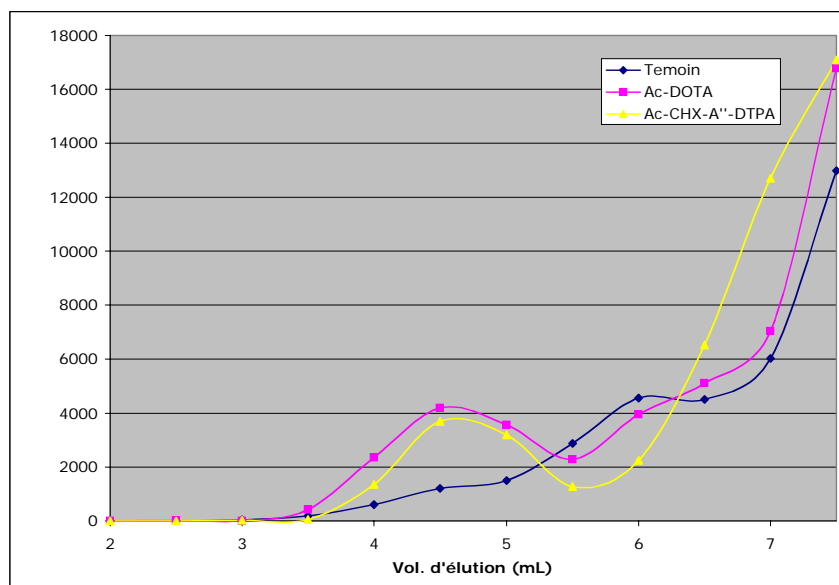


Figure 35 : Profil d'éluion sur Sephadex® G25 d'anticorps-DOTA couplés au plomb-212 (rose), d'anticorps-CHX-A''-DTPA couplés au plomb-212 (jaune) et du témoin plomb-212 libre (bleu).

5. Marquage à l'astate-211

a. Tests de couplage synthon-astate-211

L'étude des conditions optimales menant au meilleur rendement de couplage entre le synthon et l'astate-211 ont donné les résultats suivant.

Dans les conditions d'ITLC-SG utilisées, le synthon marqué à l'astate-211 migre avec un $R_f = 0,66$ (identique à une référence marquée à l'iode-125). Les différents essais de couplage sont représentés ci dessous (Figure 36):

QuickTime™ et un décompresseur TIFF (non compressé) sont requis pour visionner cette image. QuickTime™ et un décompresseur TIFF (non compressé) sont requis pour visionner cette image. QuickTime™ et un décompresseur TIFF (non compressé) sont requis pour visionner cette image.

A B C D E F G H

Figure 36 : Radiomarquage à l'astate, A : astate seul, B : astate + Oxydant, C,D,E,F : Marquage à concentrations variables en oxydant et en précurseur. G : référence marquage à l'iode-125, H : référence acide astato-benzoïque

Les résultats des marquages obtenus avec des variations de la concentration en agent oxydant (N-chlorosuccinimide) et en précurseur (N-hydroxysuccinimidyl de 3-triméthylstannybenzoate) sont récapitulés ci dessous (Tableau 11).

Tableau 11 : Résultats des marquages à l'astate-211 avec variation des concentrations en précurseur et en oxydant

Précurseur	Oxydant	A (^{211}At)	n(^{211}At)	Précurseur/oxydant	Rendement
20 nmol	100 nmol	1 MBq	62,1 fmol	1/5 équivalents	98,9 %
2 nmol	10 nmol	1 MBq	62,1 fmol	1/5 équivalents	70,8 %
200 pmol	1 nmol	1 MBq	62,1 fmol	1/5 équivalents	45,5 %
20 pmol	100 pmol	1 MBq	62,1 fmol	1/5 équivalents	63, 5 %

D'autres tests, où la quantité d'oxydant est maintenue constante, sont réalisés, les ITLC-SG obtenues sont représentées Figure 37.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

A B C D E F G H

Figure 37 : Résultats de marquage à l'astate, A : astate seul, B : astate + oxydant, C,D,E,F: marquage à l'astate avec quantité fixe d'oxydant et quantité de précurseur variable, G : référence marquée à l'iode-125, H : référence acide astato-benzoïque

Les résultats obtenus sont les donnés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Résultats des marquages à l'astate-211 avec variation des concentrations en précurseur

Précurseur	Oxydant	A (^{211}At)	n(^{211}At)	Précurseur/oxydant	Rendement
20 nmol	100 nmol	1,7 MBq	105,5 fmol	1/5 équivalents	90 %
2 nmol	100 nmol	1,7 MBq	105,5 fmol	1/50 équivalents	70,5 %
200 pmol	100 nmol	1,7 MBq	105,5 fmol	1/500 équivalents	60,7 %
20 pmol	100 nmol	1,7 MBq	105,5 fmol	1/5000 équivalents	56,9 %

- Purification du synthon marqué à l'astate par HPLC :

Les différents temps de rétention obtenus sont répertoriés dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Temps de rétention HPLC du précurseur stannique et des marquages à l'astate

Molécules	Temps de rétention (min)	Détection UV	Détection radioactive	Intensité du pic (%)
Temps mort de colonne	3,2	+	+	/
Acide astatobenzoïque	15,6	-	+	96,7
N-hydroxysuccinimidyl d'astatobenzoate	16,1	-	+	86,1
N-hydroxysuccinimidyl de 3-triméthylstannybenzoate	24,7	+	-	/

Le profil obtenu présente une aire sous le pic correspond au rendement calculé par l'ITLC-SG révélée au phosphor-imager.

- Purification du synthon marqué à l'astate par SepPak C₁₈

Après la première élution de la colonne (4 mL d'eau TFA 0,1%), l'ensemble de la radioactivité reste fixée sur la colonne, cette activité est éluée dans les fractions allant du 3^{ème} au 6^{ème} millilitres de mélange eau TFA 0,1%/Methanol 5 :5. Des essais à froid montrent que le précurseur N-hydroxysuccinimidyl de 3-triméthylstannylbenzoate que nous cherchions à éliminer pour augmenter le rendement de couplage au vecteur immunologique n'est pas élué dans cette fraction.

b. Marquage Sytnhon-BSA

Le résidu sec obtenu après évaporation des 4 mL de fractions SepPak C18 se couple avec la sérum-albumine bovine avec un rendement de 63% (Figure 38).

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 38 : Couplage de la BSA avec un synthon marqué à l'astate-211. 1 : référence de non-couplage avec l'acide astatobenzoïque. 2 : couplage avec le N-hydroxysuccinimidyl d'astatobenzoate.

C. DISCUSSION

1. Bismuth – 213

Les différentes études menées au sein de l'unité U601 de l'INSERM ont permis d'optimiser l'éluion du générateur en réduisant le volume de l'éluât menant à un gain de temps non négligeable en regard de la brève demi-vie physique de l'isotope (46 minutes) et à une amélioration de l'activité volumique. Une autre voie d'optimisation de cette éluion est en cours d'étude, elle consiste à automatiser cette dernière à l'aide d'une pompe péristaltique ce qui, en plus du gain de temps apporté, devrait améliorer la radioprotection du personnel manipulant l'isotope. Les différents marquages d'immunovecteurs ont permis d'obtenir des anticorps marqués au bismuth-213 dans un temps moyen de 43,8 minutes avec une pureté radiochimique de 98,4 % compatible avec une utilisation en clinique. Les activités spécifiques obtenues sont directement dépendantes de la masse d'anticorps engagée. Il est à noter qu'une activité spécifique de 20 mCi/mg correspond à environ un anticorps radiomarqué sur 1 500.

Les anticorps ainsi radiomarqués ont été utilisés en vue d'essais *in vivo* sur un modèle murin de type *nude* ayant été greffé par des cellules de myélome humain. Les résultats obtenus par l'équipe de radiobiologie expérimentale de l'INSERM U601 (Figure 39) permettent de démontrer une nette efficacité dose dépendante en termes de croissance du volume tumoral par rapport aux valeurs témoins.

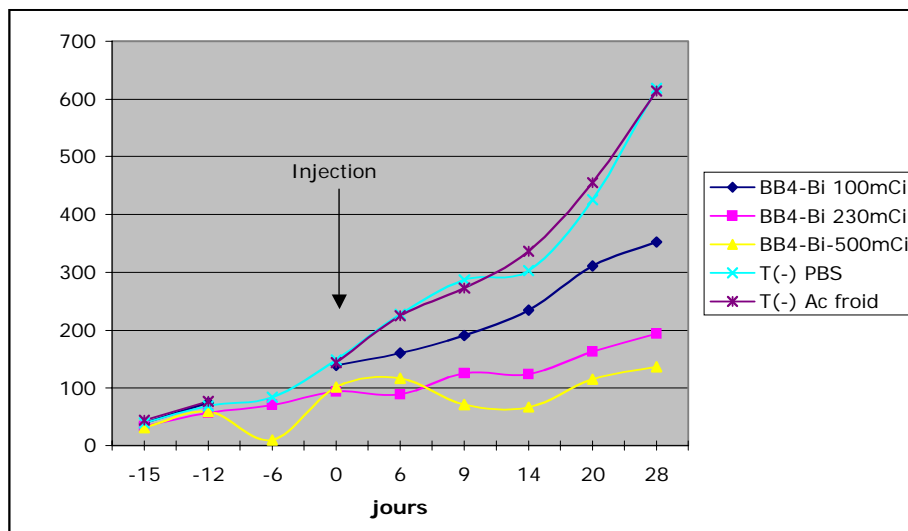


Figure 39 : Evolution du volume tumoral (en mm³) après injection de 3 doses d'anticorps B-B4 couplé au bismuth-213 (100, 230 et 500 mCi) comparativement à une injection de tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) et d'anticorps froid.

La faisabilité clinique d'une radio-immunothérapie utilisant le bismuth-213 a été démontrée en 1996 par un essai clinique de phase I au Memorial Sloan Kettering Cancer Center de New York (USA) en utilisant un anticorps humanisé anti-CD33 dans le traitement de leucémie myéloïde [55]. Le traitement a été bien supporté sans accident de toxicité aiguë avec une réduction significative de cellules pathologiques dans la moelle osseuse.

Le principal inconvénient du bismuth-213 est sa faible demi-vie physique, difficilement compatible avec la pharmacocinétique du vecteur. En effet, un grand nombre d'émissions de particules alpha ont lieu durant la biodistribution avant la fixation du vecteur à la tumeur.

2. Bismuth-212 et Plomb-212

Les différents tests de couplage réalisés avec le plomb-212 et avec son descendant, le bismuth-212 ont démontré que le marquage à un anticorps monoclonal est réalisable. Le générateur de thorium-228 qui nous a été fourni par la société Areva, dans un but de valorisation des déchets nucléaires, étant d'activité trop faible, les essais de couplage n'ont pas pu être poussés plus en avant. Néanmoins, l'utilisation du plomb-212 comme générateur *in vivo* de bismuth-212 est une alternative intéressante à l'utilisation du bismuth-213 pour plusieurs raisons : le générateur de thorium-228 possède une demi-vie de 1,9 ans ce qui est nettement plus avantageux au niveau logistique pour un service de médecine nucléaire que l'actinium-225 (demi vie = 10 jours) qui est peu disponible. De plus, l'utilisation d'un générateur *in vivo* à base de plomb-212 permet un gain notable au niveau de la demi-vie physique du radioélément. En effet, les 46 minutes du bismuth-213 ne sont pas particulièrement adaptées à la pharmacocinétique de distribution d'un vecteur immunologique. Cependant, la faisabilité d'un vecteur couplé de façon stable au plomb-212 n'est pas encore établie. Les techniques de complexation habituelle s'avérant instable d'autres techniques utilisant par exemple un vecteur rapidement internalisé dans la cellule tumorale ou utilisant un agent de complexation de type HEHA retenus captif dans des liposomes sont en cours d'évaluation.

Le bismuth-212 (demi-vie = 60 minutes) a été utilisé pour des essais *in vivo* dans différents modèles murins de tumeurs hématologiques [56] ou de cancers colo-rectaux [57], et a démontré une augmentation de la survie des animaux avec une toxicité acceptable. Le plomb-212 (demi-vie = 10 heures) est le père du bismuth-212 et peut être utilisé en tant que générateur *in vivo*. Une étude sur un modèle de carcinome colique murin [58] a démontré un fort relargage du bismuth-212 au niveau sanguin engendrant une forte toxicité médullaire. Cette instabilité semble due à une radiolyse du vecteur lors de la décroissance radioactive [58] et nécessite un fort travail d'optimisation afin de limiter le relargage d'isotopes libres pouvant présenter une forte radiotoxicologie pour les tissus sains.

3. Astate-211

Face aux brèves demi-vie des isotopes 212 et 213 du bismuth ainsi qu'à l'instabilité du marquage au plomb-212, le radiomarquage d'un vecteur par de l'astate-211 apparaît comme une approche intéressante. La stabilité du couplage entre l'astate-211 et un vecteur immunologique nécessite un marquage en deux temps dit « marquage indirect ». L'optimisation du marquage de l'astate à un synthon organique est aujourd'hui réalisée avec un rendement satisfaisant de l'ordre de 90 %. Néanmoins, les conditions stœchiométriques utilisées sont telles que la quantité de précurseur n'ayant pas réagi (environ 20 nmol) se trouve en large excès par rapport au synthon marqué à l'astate (environ 50 fmol). Afin d'optimiser le couplage de ce synthon à une protéine, il est apparu comme nécessaire de séparer le précurseur n'ayant pas réagi du synthon marqué à l'astate. Une méthode de purification sur colonne Seppak-C18 a été mise au point et a permis de marquer de l'albumine sérique bovine. La faisabilité de marquage d'une protéine à l'astate étant démontrée, il reste à optimiser les conditions de marquage afin d'obtenir un anticorps radiomarké présentant une activité spécifique satisfaisante pour mener des tests cellulaires *in vitro* et des tests animaux *in vivo*. Ces différents essais seront comparés aux différents résultats obtenus avec le bismuth-213 et l'iode-131 en vue de la réalisation d'un essai clinique.

Différents essais chez l'animal [59, 60] ont démontré une efficacité de la radio-immunothérapie alpha à l'astate-211 dans des modèles de leucémies. Un essai clinique de phase I a été mené sur 42 patients atteints de gliomes et a confirmé le potentiel thérapeutique de cette méthodologie [61].

CONCLUSION

Si la radio-immunothérapie, utilisant des isotopes émetteurs de particules bêta moins comme l'iode-131 ou l'yttrium-90, est aujourd'hui devenue courante en thérapie anti-cancéreuse dans les hémopathies malignes, elle trouve des limites du fait des caractéristiques physiques de désintégration des isotopes qu'elle utilise. Le rayonnement consécutif à une désintégration β^- présente un transfert d'énergie linéique relativement faible induisant une faible densité d'ionisation tout au long de son parcours qui varie de quelques millimètres à quelques centimètres dans les tissus mous. Ce type d'irradiation est donc plus adapté au traitement des tumeurs solides exprimant une forte densité antigénique. Les rayonnements alpha présentent à l'inverse un transfert d'énergie linéique élevé avec par conséquent une forte densité d'ionisation sur une faible distance. Ce type de rayonnement particulaire semble donc plus adapté au traitement de cancers diffus comme les leucémies ou le myélome multiple ainsi que pour le traitement de la maladie résiduelle. Néanmoins, un effet indirect peut être attendu pour les cancers solides par irradiation du microenvironnement supportant la tumeur. De plus, le fort potentiel radiotoxique des particules alpha permet de cibler des antigènes faiblement représentés. La radio-immunothérapie alpha est une méthodologie émergente dans l'arsenal thérapeutique anti-cancéreux [14, 40] et les premiers isotopes d'intérêts sélectionnés pour une étude de faisabilité en clinique sont ceux présentant une demi-vie suffisamment longue pour être compatible avec la pharmacocinétique d'un anticorps.

L'unité nantaise U601 de l'INSERM est actuellement la seule équipe française à disposer des autorisations nécessaires pour travailler sur des émetteurs alpha à dessein clinique et a acquis sur ce sujet une expertise internationalement reconnue. Le myélome multiple est une hémopathie maligne pour laquelle il n'existe pas de stratégie thérapeutique efficace et dont le caractère diffus semble adapté à la radio-immunothérapie alpha. Des essais *in vitro* ont montré que les cellules myélomateuses étaient efficacement ciblées à l'aide de l'anticorps B-B4 spécifique du syndécan 1 (heparan sulfate CD 138) exprimé sur les cellules tumorales de la totalité des patients atteints de myélome multiple [62]. L'utilisation de l'anticorps B-B4 couplé au bismuth-213 a démontré une réelle efficacité en termes de mortalité cellulaire (mesurée par incorporation de thymidine tritiée ou par test de survie clonogénique) [66]. Bien que la supériorité de la radio-immunothérapie alpha au bismuth-213 ait été démontrée sur la radio-immunothérapie bêta à l'iode-131 [42], un essai clinique de phase I avec l'anticorps B-B4 marqué à l'iode-131 est en cours au vue des résultats satisfaisants obtenus avec l'iode-131 en ce début d'année 2007. Cet essai clinique promu par le CHU de Nantes permettra d'évaluer les paramètres de biodistribution et de pharmacocinétique chez l'homme en vue de valider l'anticorps pour un essai clinique de radio-immunothérapie alpha.

La limitation essentielle du bismuth-213 repose sur la brève demi-vie de cet isotope, mon travail a été de démontrer la faisabilité du couplage entre un vecteur de nature protéique et l'astate-211 qui présente des caractéristiques physiques plus adaptées à la radio-immunothérapie α . Il est à noter que ce modèle de couplage astate-synthon-anticorps est polyvalent et qu'il est transposable à tout autre couple anticorps monoclonal – antigène tumoral. De plus, la demi-vie relativement longue de l'astate-211 peut permettre l'application d'une technique en deux temps dite « *Affinity Enhancement System : AES* » [67] permettant de réduire notablement la dose radioactive délivrée aux tissus sains et de minimiser les effets délétères dus à l'irradiation de l'anticorps durant sa biodistribution

La radio-immunothérapie alpha apparaît donc comme une méthodologie innovante dans l'alternative thérapeutique anti-cancéreuse qu'elle propose dans le traitement de certaines tumeurs. Cette thématique nantaise est appelée à se développer dans les années à venir avec la construction d'un cyclotron de haute énergie (ARRONAX) à Nantes qui produira des isotopes émetteurs alpha dès sa mise en service.

Annexes

ANNEXE I: Anticorps monoclonaux titulaires d'AMM ou d'ATU

Nom commercial	DCI	Type d'Ig	Antigène cible	Indication	Année
<i>Anticorps monoclonaux utilisés en oncologie</i>					
Avastin ¹	Bevacizumab	IgG1 Humanisée	VEGF	Cancer colorectal	2005
Erbix ¹	Cetuximab	IgG1 Chimérique	EGFR	Cancer Colorectal	2004
Herceptin ¹	Trastuzumab	IgG1 Humanisée	Her-2	Carcinome mammaire	2000
Mabcampath ¹	Alemtuzumab	IgG1 κ Humanisée	CD-52	Leucémie lymphoïde chronique	2001
Mabthera ¹	Rituximab	IgG1 Chimérique	CD-20	Lymphome malin non hodgkinien	1998
Mepolizumab ²	Mepolizumab	IgG1 Humanisée	IL5	Syndrome Hyper Eosinophile	2005
Mylotarg ^{2,3}	Gemtuzumab ozogamicine	IgG4 κ Humanisée	CD-33	Leucémie myéloïde chronique	2005
Zevalin ^{1,4}	Ibritumomab tiuxetan	IgG1 κ Murine	CD-20	Lymphome malin non hodgkinien	2004
<i>Anticorps monoclonaux utilisés contre le rejet des xenogreffes</i>					
Leucotac ²	Inolimomab	IgG2a Murine	IL2	Réaction greffon contre l'hôte	2005
Orthoclone OKT3 ¹	Murumonab	IgG2a Murine	CD-3	Rejet aigu	1999
Simulect ¹	Basiliximab	IgG1 κ Chimérique	IL2a	Rejet du transplant	1999
Zenapax ¹	Daclizumab	IgG1 Humanisée	IL2	Prophylaxie du rejet aigu de rein	1999
<i>Anticorps monoclonaux utilisés dans les maladies auto-immunes</i>					
Humira ¹	Adalimumab	IgG1 Chimérique	TNFα	Polyarthrite rhumatoïde	2003
Remicade ¹	Infliximab	IgG1 Chimérique	TNFα	Maladie de Crohn, Polyarthrite rhumatoïde, Psoriasis	1999
Raptiva ¹	Efalizumab	IgG1 Humanisée	CD-11a	Psoriasis	2005
<i>Anticorps monoclonaux utilisés dans des indications diverses</i>					
Digidot ¹	Fab Ig Digoxine	Fragment Fab ovin	digitalique	Intoxication aux digitaliques	1996
Reopro ¹	Abciximab	Fragment Fab chimérique humanisé de type Ig1	GPIIb/IIIa	Ischémie myocardique	1995
Xolair ¹	Omalizumab	IgG1 κ chimérique	IgE	Asthme	2006
Synagis ¹	Palivizumab	Humanisé	VRS	Infection au virus respiratoire syncytial	2000

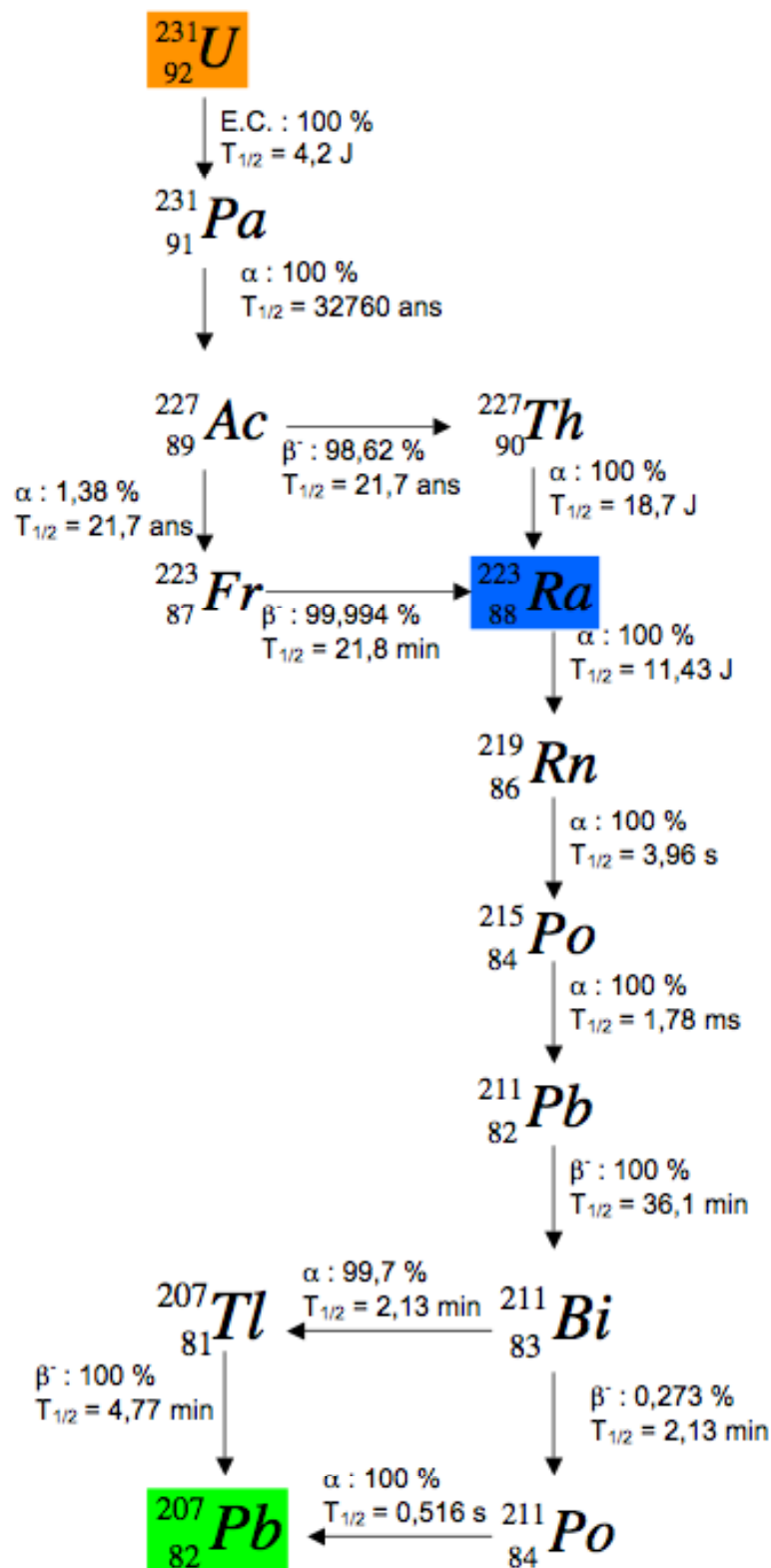
¹ Anticorps monoclonal titulaire d'une autorisation de mise sur le marché

² Anticorps monoclonal titulaire d'une autorisation temporaire d'utilisation

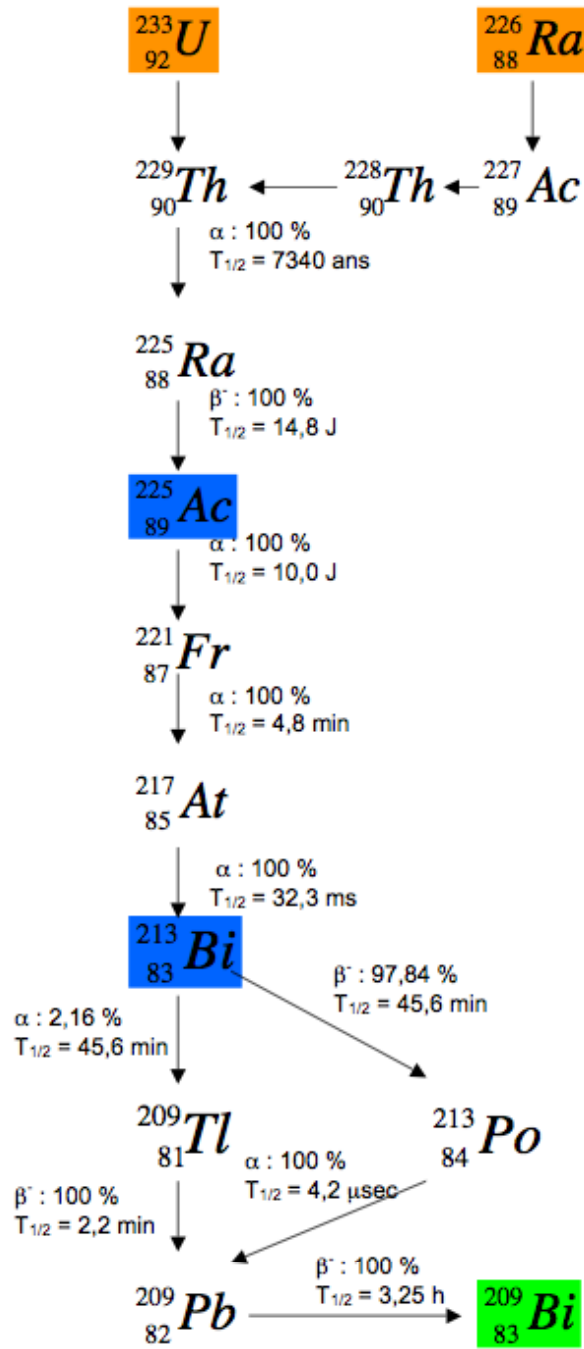
³ Afin d'augmenter son activité tumoricide, l'anticorps est couplé à un composé antibiotique antitumoral (N-acetyl-γ-calicheamicin dimethylhydrazine), l'ozogamicin [11].

⁴ Afin d'augmenter son activité tumoricide, l'anticorps est couplé, via à un agent chélatant de type MX-DTPA (tiuxetan), à un isotope émetteur β⁻, l'yttrium-90 [63].

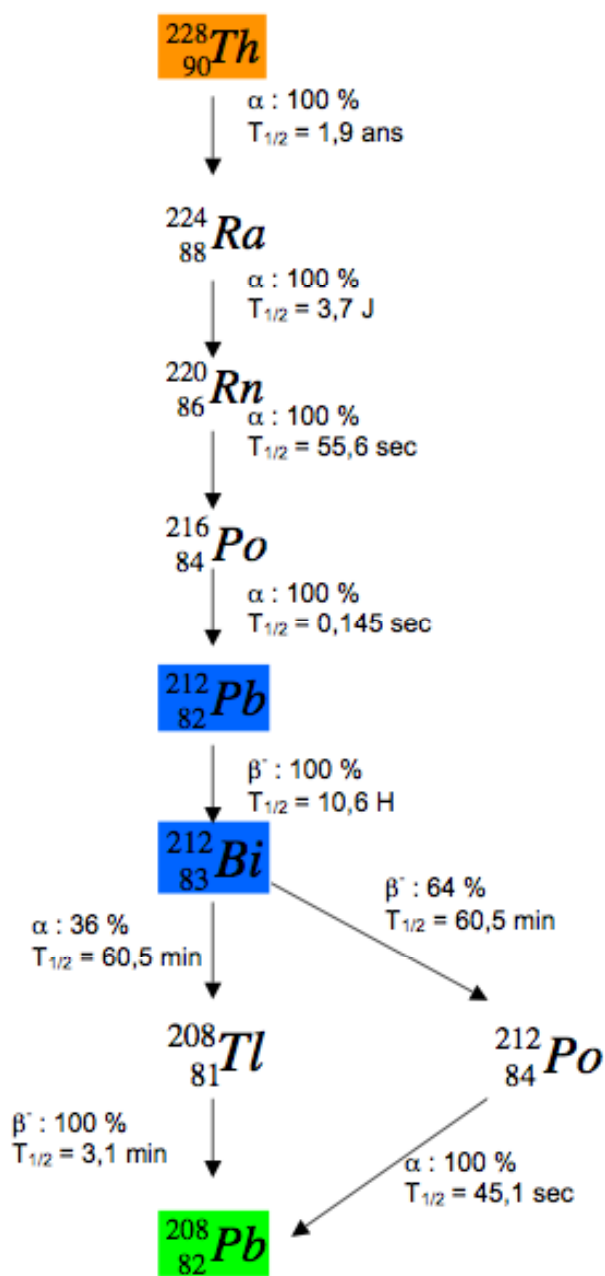
ANNEXE II : Filiation radioactive du radium-223



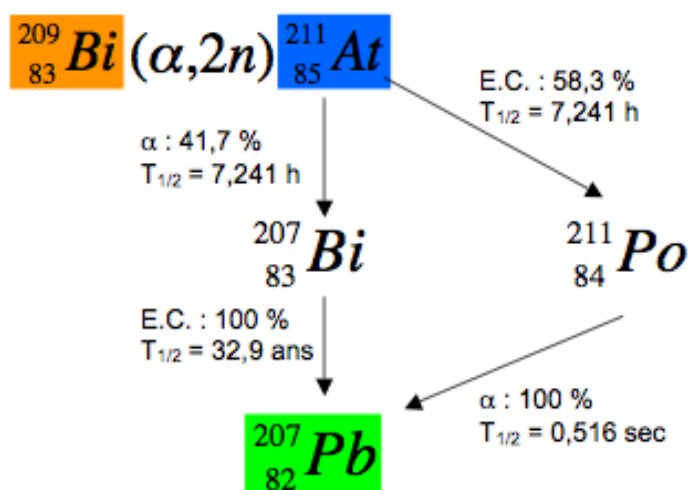
ANNEXE III : Filiation radioactive de l'actinium-225 et du bismuth-213



ANNEXE IV : Filiation radioactive du plomb-212 et du bismuth-212



ANNEXE V : Filiation radioactive de l'astate-211



ANNEXE VI : Préparation des différents milieux réactionnels

Tampon carbonate 50 mmol/L ; pH = 8,6 (pour couplage d'anticorps)

- bicarbonate de sodium (Na_2CO_3 ; MM = 124,01 g/mol) : 124 mg
- hydrogencarbonate de sodium (NaHCO_3 ; MM = 84,01 g/mol) : 2,016 g
- Chlorure de sodium (NaCl ; MM = 58,04 g/mol) : 4,384 g
- EthylèneDiamineTétra-acetic acid (EDTA ; MM = 416,22 g/mol) : 1,038 g
- Eau : qsp 500 mL
- HCl ou NaOH : qsp pH=8,6

Tampon citrate 0,1 mol/L ; pH = 5,3 (pour migration ITLC-SG)

- Acide citrique (MM = 192,12 g/mol) : 10,51 g
- Eau : 500 mL
- NaOH : qsp pH = 5,3

Tampon phosphate 0,1 mol/L ; pH = 7,2 (pour purification sur PD-10)

- Sodium phosphate monobasique (NaH_2PO_4 ; MM = 119,98 g/mol) : 3,6 g
- Sodium phosphate dibasique heptahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; MM = 268,07 g/mol) : 18,767 g
- Eau : 1 L
- Résine Chelex 100 Mesh : pointe de spatule

Tampon acétate d'ammonium 0,1 mol/L ; pH = 5,6 (pour purification sur PD-10)

- Acétate d'ammonium (MM = 77,08 g/mol) : 1,927 g
- Eau : 250 mL
- HCl : qsp pH = 5,6
- Résine Chelex 100 Mesh : pointe de spatule

Tampon citrate/acétate (0,25 – 1,5 mol/L) ; pH = 5,6 (pour marquage au ^{213}Bi)

- Acide citrique (MM = 192,12 g/mol) : 0,788 g
- Acétate de sodium (MM = 82,03 g/mol) : 1,846 g
- NaOH : qsp pH = 5,6
- Eau : 15 mL
- Résine Chelex 100 Mesh : pointe de spatule

Tampon acétate 1 mol/L ; pH = 5,6 (pour marquage au ^{212}Pb)

- Acétate d'ammonium (MM = 77,08 g/mol) = 38,54 g
- Eau : 500 mL
- HCl : qsp pH = 5,6
- Résine Chelex 100 Mesh : pointe de spatule

Figures et Tableaux

Figure 1 : Rôle du macrophage dans l'immunité non spécifique :	4
Figure 2 : Déroulement de la réponse immunitaire spécifique dite « acquise »	5
Figure 3 : Electrophorèse des protéines plasmatiques	6
Figure 4 : représentation 3D d'une immunoglobuline	7
Figure 5 : Représentation schématique d'une immunoglobuline	7
Figure 6 : Représentation schématique d'un anticorps	8
Figure 7 : Sites de clivages d'une immunoglobuline par la pepsine et par la papaïne	11
Figure 8 : Configuration spatiale des sites épitopiques	11
Figure 9 : Production d'anticorps monoclonaux	13
Figure 10 : Méthodes de sélection et de production des hybridomes myélome-plasmocyte sur milieu H.A.T.	15
Figure 11 : Production d'anticorps chimériques souris-humains par génie génétique	17
Figure 12 : Anticorps monoclonaux modifiés	18
Figure 13 : Représentation des différentes formes d'anticorps avec leurs sites de liaisons à l'antigène (Ag) obtenus par la technique du phage display	19
Figure 14 : Cycle cellulaire	24
Figure 15 : Effets directs (à droite) et indirects (à gauche) des rayonnements ionisant sur l'ADN.	24
Figure 16 : Effets directs et indirects des rayonnements ionisants sur une cellule	25
Figure 17 : Mécanismes d'entrée en apoptose d'une cellule exposée aux rayonnements ionisants	26
Figure 18 : Irradiation d'une cellule cancéreuse par un anticorps radiomarqué	32
Figure 19 : Marquage direct d'un peptide à l'iode	33
Figure 20 : Fixation d'un groupement prosthétique à un peptide	34
Figure 21 : Exemples de groupements prosthétiques utilisables pour une iodation	34
Figure 22 : Exemples de groupements prosthétiques utilisables pour la complexation des métaux	35
Figure 23 : Augmentation de l'AS par immunoliposomes	39
Figure 24 : système avidine-biotine en 3 temps	40
Figure 25 : Stratégie AES en 2 temps	41
Figure 26 : Différence de trajet et de la densité d'ionisation entre l'iode-131 et le bismuth-213	42
Figure 27 : Moyen d'obtention de l'astate-211 par la voie humide	47
Figure 28 : Agent complexant d'intérêt pour le bismuth	48
Figure 29 : Réaction de marquage de l'astate par substitution électrophile d'un groupement stannyl	49
Figure 30 : Différentes molécules testées : N-hydroxysuccinimidyl d'astatobenzoate, N-hydroxysuccinimidyl de iodobenzoate et acide astatobenzoïque	53
Figure 31 : Profil d'élution sur Sephadex® G25 de protéines couplées au CHX-A''-DTPA et au p-SCN-Bn-DOTA	55
Figure 32 : Image obtenu au phosphor-imager du rendement de couplage	55
Figure 33 : Profil d'élution sur Sephadex® G25 d'anticorps couplés au bismuth-212 et du témoin bismuth-212 libre	56
Figure 34 : ITLC-SG en tampon citrate du plomb libre de l'anticorps-CHX-A''-DTPA marqué au plomb et de l'anticorps-DOTA marqué au plomb	57
Figure 35 : Profil d'élution sur Sephadex® G25 d'anticorps-DOTA couplés au plomb-212, d'anticorps-CHX-A''-DTPA couplés au plomb-212 et du témoin plomb-212 libre	57
Figure 36 : Radiomarquage à l'astate	58
Figure 37 : Résultats de marquage à l'astate	59
Figure 38 : Couplage de la BSA avec un synthon marqué à l'astate-211	60
Figure 39 : Evolution du volume tumoral (en mm ³) après injection de 3 doses d'anticorps B-B4 couplé au bismuth-213	61

Tableau 1 : Propriété des différents isotopes d'immunoglobulines	9
Tableau 3 : différents types d'anticorps utilisés en thérapeutique	29
Tableau 4 : Radionucléides d'intérêt en immunoscintigraphie	31
Tableau 5 : émetteurs de positons utilisables en immunoTEP	31
Tableau 6 : Radionucléide émetteurs β^- à potentiel thérapeutique	32
Tableau 7 : efficacité du traitement chez des patients à lymphome réfractaire/récidivant après chimiothérapie.	36
Tableau 8: principaux isotopes émetteurs alpha et caractéristiques de désintégration	45
Tableau 9 : radiomarquage avec le bismuth-213, le bismuth-212 et le plomb-212	52
Tableau 10: Résultats des marquages au bismuth-213	56
Tableau 11 : Résultats des marquages à l'astate-211 avec variation des concentrations en précurseur et en oxydant	58
Tableau 12 : Résultats des marquages à l'astate-211 avec variation des concentrations en précurseur	59
Tableau 13 : Temps de rétention HPLC du précurseur stannique et des marquages à l'astate	59

Bibliographie

1. Becker C.,
La médecine nucléaire: de la radioactivité à la naissance d'une spécialité.
50 ans de médecine à l'UCL (1950-2000), 2000. Editions RACINE
(<http://www.md.ucl.ac.be/histoire/livre/mnuc.pdf>).
2. Goldsby R.A., Kindt T.J. and Osborne B.A.,
Immunologie: Vue d'ensemble du système immunitaire.
Immunologie, le cours de J. Kuby, 2003. Edition DUNOD: p. 3-26.
3. Marieb E.N.,
Défenses non spécifiques de l'organisme et système immunitaire.
Anatomie et physiologie humaines 1993, 2eme Edition.
Edition De Boeck Univerité: p. 689-723.
4. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A. and V.W., R.,
Plasma proteins & Immunoglobulins.
Harper's Illustrated Biochemistry, 2003, 26th Edition.
Edition McGraw-Hill: p. 580-597.
5. <http://tutor.lscf.ucsb.edu/instdev/sears/immunology/info/sears-ab.htm>.
6. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J.D.,
The Immune System: The functional properties of antibodies.
Molecular biology of cell, 1994, 3rd edition.
Edition GARLAND: p. 1195-1254.
7. Goldsby R.A., Kindt T.J. and Osborne B.A.,
Interaction Antigène-Anticorps.
Immunologie, le cours de J. Kuby, 2003.
Edition DUNOD: p. 149-172.
8. Goldsby R.A., Kindt T.J. and Osborne B.A.,
Immunoglobulines: Structure et fonction.
Immunologie, le cours de J. Kuby, 2003.
Edition DUNOD: p. 83-113.
9. Goldsby R.A., Kindt T.J. and Osborne B.A.,
Organisation et expression des gènes des immunoglobulines.
Immunologie, le cours de J. Kuby, 2003.
Edition DUNOD: p. 115-147.
10. Davol P.A., Smith J.A., Kouttab N., Elfenbein G.J. and Lum L.G.,
Anti-CD3 x anti-HER2 bispecific antibody effectively redirects armed T cells to inhibit tumor development and growth in hormone-refractory prostate cancer-bearing severe combined immunodeficient beige mice.
Clin Prostate Cancer, 2004. 3(2): p. 112-121.
11. Brethon B., Auvrignon A., Galambrun C., Yakouben K., Leblanc T., Bertrand Y.,
Leverger G. and Baruchel A.,
Efficacy and tolerability of gemtuzumab ozogamicin (anti-CD33 monoclonal antibody, CMA-676, Mylotarg) in children with relapsed/refractory myeloid leukemia.
BMC Cancer, 2006. 28(6): p. 172-178.

12. Pini A. and Bracci L.,
Phage display of antibody fragments.
Current Protein and Peptide Science, 2000. 1: p. 155-169.
13. Takemura S., Asano R., Tsumoto K., Ebara S., Sakurai N., Katayose Y., Kodama H., Yoshida H., Suzuki M., Imai K., Matsumo S., Kudo T. and Kumagai I.,
Construction of a diabody (small recombinant bispecific antibody) using a refolding system.
Protein Engineering, 2000. 13(8): p. 583-588.
14. Goldenberg D.M.,
Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies.
J. Nucl. Med., 2002. 43: p. 693-713.
15. Oriuchi N., Endo K., Watanabe N., Sugiyama S., Asao T., Takenoshita S., Nagamachi Y. and Baum R.P.,
Semiquantitative SPECT tumor uptake of technetium-99m-labeled anti-CEA monoclonal antibody in colorectal tumor.
J. Nucl. Med., 1995. 36(4): p. 679-683.
16. Line B.R., Keenan J.F., Lukasiewicz R.L., Dansereau R.N., Tublin M.E., Williams L.M. and Gargan P.E.,
Cardiopulmonary thromboembolism detected by Tc-99m MH-1 antifibrin antibody. Clin. Nucl. Med., 1997. 22(6): p. 376-379.
17. Von Rothenburg T., Schaffstein J., Ludwig J., Vehling D., Koster O. and Schmid G.,
Imaging osteomyelitis with Tc-99m-labeled antigranulocyte antibody Fab' fragments. Clin. Nucl. Med., 2003. 28(8): p. 643-647.
18. Krasner C. and Joyce R.M.,
Zevalin: 90Yttrium labeled anti-CD20 (ibritumomab tiuxetan), a new treatment for non-Hodgkin's lymphoma.
Curr. Pharm. Biotechnol., 2001. 2(4): p. 341-349.
19. Pouget J.P. and Mather S.J.,
General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging, 2001. 28(4): p. 541-561.
20. Whitlock J.L., Roeske J.C., Dietz M.L., Straus C.M., Hines J.J., Horwitz E.P., Reba R.C. and Rotmensch J.,
Radionuclide therapy for the treatment of microscopic ovarian carcinoma: an overview. Ind. Eng. Chem. Res. , 2000. 39: p. 3135-3139.
21. Imbert-Marcille B.M., Thedrez P., Sai-Maurel C., Francois C., Auget J.L., Benard J., Jacques Y., Imai S. and Chatal J.F.,
Modulation of associated ovarian carcinoma antigens by 5 cytokines used as single agents or in combination.
Int. J. of Cancer, 1994. 57(3): p. 392-398.
22. Schlumberger M., Arcangioli O., Piekarski J.D., Tubiana M. and Parmentier C.,
Detection and treatment of lung metastases of differentiated in patients with normal chest X-rays.
J. Nucl. Med., 1988. 29(11): p. 1790-1794.
23. Eary J.F., Durack L., Williams D. and Vanderheyden J.L.,
Considerations for imaging Re-188 and Re-186 isotopes.
Clin. Nucl. Med., 1990. 15(12): p. 911-916.

24. Huang L., Kim P.M., Nickoloff J.A. and Morgan W.F.,
Targeted and nontargeted effects of low-dose ionizing radiation on delayed genomic instability in human cells.
Cancer Research, 2007. 67(3): p. 1099-1104.
25. Volkert W.A. and Hoffman T.J.,
Therapeutic radiopharmaceuticals.
Chem. Rev., 1999. 99: p. 2269-2292.
26. *National Nuclear Data Center, Brookhaven National Laboratory.*
<http://www.nndc.bnl.gov/chart/>.
27. Sundaresan G., Yazaki P.J., Shively J.E., Finn R.D., Larson S.M., Raubitschek A.A., Williams L.E., Chatziioannou A.F., Gambhir S.S. and Wu A.M.,
124I-labeled engineered anti-CEA minibodies and diabodies allow high-contrast, antigen specific small-animal PET imaging of xenografts in athymic mice.
J. Nucl. Med., 2003. 44(12): p. 1962-1969.
28. Schubiger P.A., Alberto R. and Smith A.,
Vehicles, chelators, and radionuclides: choosing the "building blocks" of an effective therapeutic radioimmunoconjugate.
Bioconjugate Chem., 1996. 7(2): p. 165-179.
29. Friesen C., Lubatschowski A., Kotzerke J., Buchmann I., Reske S.N. and Debatin K.M.,
Beta-irradiation used for systemic radioimmunotherapy induces apoptosis and activates apoptosis pathways in leukaemia cells.
Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging, 2003. 30(9): p. 1251-1261.
30. Schering, Laboratory,
Radio-immunotherapie: l'option thérapeutique moderne dans le traitement des lymphomes non hodgkiniens. 2006.
31. Coenen H.H., Mertens J. and Maziere B.,
Electrophilic substitution.
Radioidination reactions for pharmaceuticals: p. 45-62.
32. Comet M. and Vidal M.,
Macromolécules d'intérêt biologique marquées à l'iode.
Radiopharmaceutiques, chimie des radiotraceurs et applications biologiques, 1998: p. 349-363.
33. Wilbur D.S.,
Radiohalogenation of proteins: an overview of radionuclides, labeling methods, and reagents for conjugate labeling.
Bioconjugate Chem., 1992. 3(6): p. 433-470.
34. Comet M. and Vidal M.,
radiomarquage des anticorps monoclonaux et des peptides par le technetium 99m-voie directe.
Radiopharmaceutiques, chimie des radiotraceurs et applications biologiques, 1998: p. 365-378.
35. Immunomedics,
LeukoScan. Résumé des caractéristiques du produit, 1997: p. 2.
36. Horger M., Eschmann S.M., Pfannenbergl C., Storek D., Dammann F., Vonthein R., Claussen C.D. and Bares R.,
The value of SPET/CT in chronic osteomyelitis.
Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging, 2003. 30: p. 1665-1673.

37. Erb D.A. and Nabi H.A.,
Clinical and technical considerations for imaging colorectal cancers with technetium-99m-labeled antiCEA Fab' fragment.
J. Nucl. Med. Technol., 2000. 28(1): p. 12-18.
38. Sodee D.B., Sodee A.E. and Bakale G.,
Synergistic value of single-photon emission computed tomography/computed tomography fusion to radioimmunoscentigraphic imaging of prostate cancer.
Semin. Nucl. Med., 2007. 37(1): p. 17-28.
39. GlaxoSmithKline Inc.,
Thérapie BEXXAR (Tositumomab et ¹³¹I-tositumomab).
Monographie de produit, 2006: p. 37-39.
40. Goldenberg D.M. and Sharkey R.M.,
Advances in cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies.
Q.J. Nucl. Med. Mol. Imaging, 2006. 50: p. 248-264.
41. Linden O., Hindorf C., Cavallin-Stahl E., Wegener W.A., Goldenberg D.M., Horne H., Ohlsson T., Stenberg L., Stand S.E. and Tennvall J.,
Dose-fractionated radioimmunotherapy in non-Hodgkin's lymphoma using DOTA-conjugated, 90Y-radiolabeled, humanized CD22 monoclonal antibody, epratuzumab.
Clin Cancer Res, 2005. 11(14): p. 5215-5222.
42. Supiot S., Faivre-Chauvet A., Couturier O., Heymann M. F., Robillard N., Kraeber-Bodere F., Morandau L., Mahe M. A. and Cherel M.,
Comparison of the biologic effects of MA5 and B-B4 monoclonal antibody labeled with iodine-131 and bismuth-213 on multiple myeloma.
Cancer, 2002. 94(4 Suppl): p. 1202-9.
43. Chatal J.F., Faivre-Chauvet A., Bardies M., Kraeber-Bodere F. and Barbet J.,
Radio-immunotherapy of solid tumors.
Médecine Nucléaire 2001. 25(11): p. 685-689.
44. Mougin-Degraef, M., Jestin, E., Bruel, D., Remaud-Le Saec, P., Morandau, L., Faivre-Chauvet, A. and Barbet, J.,
High-activity radio-iodine labeling of conventional and stealth liposomes.
J Liposome Res, 2006. 16(1): p. 91-102.
45. Sharkey R.M. and D.M., G.,
Perspectives on cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies.
J. Nucl. Med., 2005. 46: p. 115S-127S.
46. Paganelli G., Bartolomei M., Ferrari M., Cremonesi M., Broggi G., Maira G., Sturiale C., Grana C., Prisco G., Gatti M., Caliceti P. and Chinol M.,
Pre-targeted locoregional radioimmunotherapy with 90Y-biotin in glioma patients: phase I study and preliminary therapeutic results.
Cancer Biother Radiopharm., 2001. 16(3): p. 227-235.
47. Kraeber-Bodere F., Faivre-Chauvet A., Sai-Maurel C., Campion L., Fiche M., Gautherot E., Le Boterff J., Barbet J., Chatal J.F. and Thedrez P.,
Toxicity and efficacy of radioimmunotherapy in carcinoembryonic antigen-producing medullary thyroid cancer xenograft: comparison of iodine 131-labeled F(ab')2 and pretargeted bivalent hapten and evaluation of repeated injections.
Clin Cancer Res, 1999. 5(10): p. 3183s-3189S.

48. Morandea, L., Benoist, E., Loussouarn, A., Ouadi, A., Lesaec, P., Mougin-Degraef, M., Faivre-Chauvet, A., Le Boterff, J., Chatal, J.F., Barbet, J. and Gestin, J.F., *Synthesis of new bivalent peptides for applications in the affinity enhancement system.* Bioconjug Chem, 2005. 16: p. 184-193.
49. Mulford D.A., Scheinberg D.A. and Jurcic J.G., *The promise of targeted alpha-particle therapy.* J. Nucl. Med., 2005. 46(199S-204S).
50. Atcher R.W., Friedman A.M., Huizenga J.R. and Spencer R.P., *A radionuclide generator for the production of Pb-212 and its daughters.* J. Radioanal. Nucl. Chem., 1989. 135: p. 215-221.
51. Ma D., McDevitt M.R., Finn R.D. and Scheinberg D.A., *Breakthrough of 225Ac and its radionuclide daughters from an 225Ac/213Bi generator: development of new methods, quantitative characterization, and implication for clinical use.* Appl Radiat Isot, 2001. 55: p. 667-678.
52. Lindegren, S., Back, T. and Jensen, H., *Dry-distillation of astatine-211 from irradiated bismuth targets: a time-saving procedure with high recovery yields.* Appl Radiat Isot, 2001. 55(2): p. 157-60.
53. Sadler P.J., Li H. and Sun H., *Coordination chemistry of metals in medicine: target sites for bismuth.* Coordination Chemistry Reviews, 1999. 185-186: p. 689-709.
54. Adams G.P., Shaller C.C., Chappell L.L., Wu C., Horak E.M., Simmons H.H., Litwin S., Marks J.D., Weiner L.M. and Brechbiel M.W., *Delivery of the alpha-emitting radioisotope bismuth-213 to solid tumors via single-chain Fv and diabody molecules.* Nucl. Med. Biol., 2000. 27: p. 339-346.
55. Garmestani K., Yao Z., Zhang M., Wong K., Park C.W., Pastan I., Carrasquillo J.A. and Brechbiel M.W., *Synthesis and evaluation of a macrocyclic bifunctional chelating agent for use with bismuth radionuclides.* Nucl. Med. Biol., 2001. 28: p. 409-418.
56. Corson, D.R., MacKenzie, K.R. and Segre, E., *Artificially radioactive element 85.* Physical Review, 1940. 58: p. 672-678.
57. Jurcic J.G., *Antibody therapy for residual disease in acute myelogenous leukemia.* Crit. Rev. Oncol. Hematol., 2001. 38(1): p. 37-45.
58. Macklis R.M., Kaplan W.D., Ferrara J.L., Atcher R.W., Hines J.J., Burakoff S.J. and Coleman C.N., *alpha particle radio-immunotherapy: animal models and clinical prospects.* Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1989. 16(6): p. 1377-1387.
59. Simonson R.B., Ultee M.E., Hauler J.A. and Alvarez V.L., *Radioimmunotherapy of peritoneal human colon cancer xenografts with site-specifically modified 212Bi-labeled antibody.* Cancer Research, 1990. 1(50): p. 985s-988s.

60. Su F.M., Beaumier P., Axworthy D., Atcher R. and Fritzberg A.,
Pretargeted radioimmunotherapy in tumored mice using an in vivo $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$ generator.
Nucl. Med. Biol., 2005. 32(7): p. 741-747.
61. Elgqvist J., Andersson H., Bernhardt P., Back T., Claesson I., Hultborn R., Jensen H., Johansson B.R., Lindegren S., Olsson M., Palm S., Warnhammar E. and Jacobsson L.,
Administered activity and metastatic cure probability during radioimmunotherapy of ovarian cancer in nude mice with $(^{211}\text{At-MX35 F(ab')_2}$.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 2006. 66(4): p. 1228-1237.
62. Zhang Z., Zhang M., Garmestani K., Talanov V.S., Plascjak P.S., Beck B., Goldman C., Brechbiel M.W. and Waldmann T.A.,
Effective treatment of a murine model of adult T-cell leukemia using $^{211}\text{At-7G7/B6}$ and its combination with unmodified anti-Tac (daclizumab) directed toward CD25. Blood, 2006. 108(3): p. 1007-1012.
63. Zalutsky M.R., Zhao X.G., Alston K.L. and Bigner D.,
High-level production of alpha-particle emitting (^{211}At) and preparation of (^{211}At) -labeled antibodies for clinical use.
J. Nucl. Med., 2001. 42(10): p. 1508-1515.
64. Wijdenes J., Vooijs W. C., Clement C., Post J., Morard F., Vita N., Laurent P., Sun R. X., Klein B. and Dore J. M.,
A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1.
Br J Haematol, 1996. 94(2): p. 318-23.
65. Macklis R.M. and Pohlman B.,
Radioimmunotherapy for non-Hodgkin's lymphoma: a review for radiation oncologists.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 2006. 66(3): p. 833-841.
66. Couturier O., Faivre-Chauvet A., Filippovich I.V., Thedrez P., Sai-Maurel C., Bardies M., Mishra A.K., Gauthier M., Blain G., Apostolidis C., Molinet R., Abbe J.C., Bataille R., Wijdenes J., Chatal J.F., Cherel M.,
Validation of ^{213}Bi -alpha radioimmunotherapy for multiple myeloma
Clin. Cancer Res., 1999. 5(10s) : p. 3165s-3170s
67. Barbet J., Kraeber-Bodere F., Vuillez J.P., Gautherot E., Rouvier E., Chatal J.F.,
Pretargeting with the affinity enhancement system for radioimmunotherapy
Cancer Biother Radiopharm., 1999. 14(3) : p. 153-166

Nom – Prénom : BOURGEOIS Mickaël

Titre de la Thèse : Immunovectorisation de radioéléments émetteurs de particules alpha ; une nouvelle voie thérapeutique en cancérologie.

Résumé de la Thèse :

La radio-immunothérapie est une thérapie anticancéreuse qui consiste à vectoriser avec des agents immunospécifiques des radioéléments très radiotoxiques sur des tumeurs ou dans leur environnement afin de les détruire.

La première partie de ce mémoire présente les différentes caractéristiques des anticorps ainsi que leurs moyens de production sous forme monoclonale spécifiquement dirigés contre un antigène tumoral d'intérêt.

La seconde partie de ce mémoire replace l'importance des vecteurs immunologiques dans le contexte de la médecine nucléaire. Il est notamment décrit les différentes méthodes qui permettent de radiomarquer le vecteur, ainsi que les différentes voies d'optimisation qui ont été envisagées pour améliorer le ciblage des radioéléments sur une tumeur. Ces différents développements permettent de définir la place potentielle de la radio-immunothérapie α dans les traitements et resituent ainsi l'intérêt de la partie expérimentale. Si la radio-immunothérapie, utilisant des isotopes émetteurs de particules β^- comme l'iode-131 ou l'yttrium-90, est aujourd'hui courante en thérapie anti-cancéreuse, elle trouve des limites du fait des caractéristiques physiques de désintégration des isotopes qu'elle utilise. En effet, comparativement aux particules α , les particules β^- déposent moins d'énergie par unité de longueur dans la matière traversée.

La partie expérimentale de ce mémoire a pour but d'étudier la faisabilité du couplage entre un vecteur immunologique et un isotope émetteur de particules alpha. Les différents essais menés sur le bismuth-213, le bismuth-212, le plomb-212 et l'astate-211 ont démontré que la fixation de ces différents radionucléides était possible. Cette thématique de recherche est aujourd'hui renforcée par la construction à Nantes d'un cyclotron à haute énergie (ARRONAX) et l'optimisation des résultats prometteurs obtenus devrait permettre une utilisation thérapeutique en oncologie de la radio-immunothérapie α .

MOTS CLES : RADIO-IMMUNOTHERAPIE, ANTICORPS MONOCLONAUX, ONCOLOGIE, RADIOPHARMACEUTIQUE, EMETTEURS ALPHA, MEDECINE NUCLEAIRE

Président : M. Alain TRUCHAUD, Professeur – UFR Pharmacie (Nantes)
Membres du jury : M. Alain FAIVRE-CHAUVET, Professeur – UFR Pharmacie (Nantes)
M. Michel CHEREL, Maître de Conférence – UFR Médecine (Nantes)
M. Jean-Claude MAUPETIT, Pharmacien – CHU de Nantes
M. Jacques BARBET, Directeur de recherche - INSERM U 601 (Nantes)
M^{me} Catherine PASSIRANI, Maître de Conférence – UFR Pharmacie (Angers)

Adresse de l'auteur : 13, rue du petit Saint Jean, 44700 Orvault