

ANNÉE 2013

N° 076

**MÉMOIRE**  
**DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE**  
**PHARMACIE SPÉCIALISÉE**

Soutenu devant le jury interrégional

Le 18 novembre 2013

Par Mathieu FRINDEL

Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février 2012  
tient lieu de :

**THÈSE**  
**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Développement de nouveaux ligands pour  
l'imagerie phénotypique-TEP au cuivre-64  
en cancérologie**

**Président :** M. Alain FAIVRE-CHAUVET, Professeur de Biophysique et Praticien Hospitalier-NANTES

**Directeur de Thèse :** M. Mickaël BOURGEOIS, Maître de Conférences de Biophysique et Praticien Hospitalier-NANTES

**Membres du jury :** M. Frank BOURY, Professeur de Biophysique-ANGERS  
M. Franck LACOEUILLE, Maître de Conférences de Biophysique et Médecine Nucléaire, Praticien Hospitalier-ANGERS  
M. Raphaël TRIPIER, Professeur de Chimie-BREST

## Remerciements

---

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements,

**À M. Alain FAIVRE-CHAUVET**, Professeur de Biophysique à la Faculté de Pharmacie de Nantes et Radiopharmacien Praticien Hospitalier au CHU de Nantes, pour me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse et de bien vouloir juger mon travail, mais également pour avoir accepté d'être mon tuteur d'internat et de m'avoir formé au métier de Radiopharmacien et à la Recherche. Merci Alain de ta confiance, tes conseils, tes compétences et ton implication dans ma carrière professionnelle.

**À M. Frank BOURY**, Professeur de Biophysique à la Faculté de Pharmacie d'Angers pour me faire l'honneur d'être membre de ce jury et de juger mon travail. Soyez assuré de toute ma considération.

**À M. Franck LACOEUILLE**, Maître de Conférences de Biophysique et de Médecine Nucléaire à la Faculté de Médecine d'Angers et Radiopharmacien Praticien Hospitalier au CHU d'Angers, pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail en acceptant de faire partie de ce jury de thèse et de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

**À Monsieur Raphaël TRIPIER**, Professeur de Chimie à l'Université de Bretagne Occidentale et Responsable de l'équipe Chélates Azotés Santé et Matériaux (ChASaM) de l'unité CNRS 6521, pour avoir accepté avec un plaisir évident de faire partie de mon jury de thèse mais aussi pour son encadrement sur ce projet de recherche, en tant que mon co-directeur de thèse d'université. Merci Raphaël de ton implication, tes conseils, ton investissement et ta pugnacité dans la rédaction et la soumission de nos articles, de ton accueil lors de mes séjours au labo et ta grande disponibilité.

**À Monsieur Mickaël BOURGEOIS**, Maître de Conférences de Biophysique à la Faculté de Pharmacie de Nantes et Radiopharmacien Praticien Hospitalier au CHU de Nantes, pour avoir accepté avec enthousiasme d'encadrer cette thèse. Merci Mickaël de m'avoir fait profiter de tes conseils et de tes larges connaissances tout au long de la rédaction mais également pendant ces deux semestres passés à ARRONAX.

**À Monsieur Michel CHEREL**, Professeur de Biophysique et de Médecine Nucléaire, Responsable de l'équipe 13 de l'unité INSERM 892 du Centre de Recherche en Cancérologie de Nantes-Angers (CRCNA), pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche.

**À Monsieur Jacques BARBET**, Directeur du cyclotron ARRONAX, pour m'avoir ouvert les portes d'ARRONAX pendant une année d'internat professionnellement et scientifiquement très enrichissante.

**Aux membres de l'équipe 13** de l'unité INSERM 892 de Nantes, qui m'apportent leur aide, leurs compétences, leurs conseils et avec qui j'ai la chance de travailler, en particulier Catherine, Patricia, Marie, Agnès, Holisoa et Jean-François.

**À tous les collègues du cyclotron ARRONAX**, avec qui j'ai eu plaisir à travailler et échanger pendant un an, tout particulièrement Ferid, Nadia, Anne-Cécile, Valérie, Johann, Céline, Thomas, Rabha, Cécile, Cyrille, Nathalie et bien sûr ma collègue de bureau Andréa.

**À toute l'équipe ChASaM** de l'unité CNRS 6521 de Brest, pour le magnifique accueil qu'elle me réserve à chacun de mes déplacements dans leur labo. Merci à Mélissa, Ronan, Zakaria, Nathalie et Maryline.

Enfin, mes pensées vont naturellement,

**À mes anciens co-internes devenus mes amis**, Aurore, Chloé, Lucile, Myriam, Nadia, Pauline ainsi que tous les internes avec qui j'ai partagé de bons moments de travail et de détente à Poitiers, Brest, Nantes et Tours. Merci en particulier à Aurore (ma complice de labo) pour m'avoir donné son avis sur ce travail et merci à Lucile et Nadia pour leurs conseils en tous genres.

**À mes amis** de longue date, Anthony, Antoine, Fabien, Fécel, Jérôme, Jean-Charles et Marion, pour leur fidélité en amitié.

**À ma famille**, pour sa présence.

**À mes parents et à ma sœur Carole**, pour leur indéfectible soutien et leurs encouragements en toutes circonstances.



I	Caractéristiques physiques .....	41
II	Production du cuivre-64 .....	42
II.1	Paramètres critiques de production (de la source de Cu-64) .....	42
II.1.1	Activité spécifique .....	42
II.1.2	Pureté radionucléidique .....	44
II.2	Les différentes voies possibles .....	45
II.2.1	Production en cyclotron .....	45
II.2.1.1	Production à partir du $^{64}\text{Ni}$ : $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ et $^{64}\text{Ni}(d,2n)^{64}\text{Cu}$ .....	45
II.2.1.2	Production à partir du $^{68}\text{Zn}$ .....	48
II.2.2	Production en réacteur nucléaire.....	49
II.2.2.1	Par capture de neutrons thermiques .....	49
II.2.2.2	Par capture de neutrons rapides .....	49
II.3	Production du Cu-64 au cyclotron ARRONAX.....	50
II.3.1	Caractéristiques du cyclotron ARRONAX.....	50
II.3.2	Voie de production retenue .....	50
II.3.3	Electrodéposition de la cible de $^{64}\text{Ni}$ .....	51
II.3.4	Extraction et purification du $^{64}\text{Cu}$ .....	52
II.3.4.1	Précautions particulières .....	53
II.3.5	Recyclage du $^{64}\text{Ni}$ .....	54
II.3.6	Contrôle qualité de la solution de $^{64}\text{CuCl}_2$ .....	54
II.3.6.1	Identification du $^{64}\text{Cu}$ et pureté radionucléidique .....	54
II.3.6.2	Mesure de l'activité.....	55
II.3.6.3	Pureté radiochimique/activité spécifique.....	55
	<b>Métabolisme du cuivre .....</b>	<b>56</b>
I	Rôle physiologique du cuivre .....	56
II	Prise en charge du cuivre au niveau cellulaire .....	58
II.1	Les chaperonnes du cuivre.....	59
II.1.1	Chaperonne CCS .....	59
II.1.2	Chaperonne Atox1 et mécanismes d'exportation du cuivre.....	60
II.1.3	Chaperonnes Cox17, Cox11 et Sco1/2 et cuivre mitochondrial .....	60
II.1.4	Autres ligands intracellulaires du cuivre .....	61
III	Homéostasie du cuivre.....	62
III.1	Ingestion.....	62
III.2	Absorption.....	63
III.3	Métabolisme hépatique .....	63
III.4	Métabolisme rénal .....	64
III.5	Métabolisme au niveau du système nerveux central .....	65
	<b>Complexation du cuivre et radiomarquages au Cu-64.....</b>	<b>66</b>
I	Caractéristiques chimiques du cuivre.....	66

II	Caractéristiques des ligands et des complexes de cuivre.....	66
II.1	Définition d'un ligand.....	66
II.2	Caractéristiques physico-chimiques idéales d'un ligand du cuivre .....	67
II.2.1	Cinétique et rendement de complexation.....	67
II.2.2	Sélectivité .....	68
II.2.2.1	Evaluation de la sélectivité d'un ligand .....	68
II.3	Caractéristiques physico-chimiques idéales d'un complexe de cuivre.....	69
II.3.1	Stabilité thermodynamique .....	69
II.3.1.1	Effet chélate.....	70
II.3.1.2	Effet macrocycle.....	70
II.3.1.3	Mesure de la constante de stabilité thermodynamique d'un complexe.....	71
II.3.2	Inertie cinétique.....	71
II.4	Bifonctionnalité du ligand et couplage ligand/vecteur .....	71
II.4.1	Les fonctions de couplage .....	72
II.4.2	Intégrité des propriétés de complexation du ligand .....	73
III	Problématiques des radiomarquages au cuivre-64 .....	74
III.1	Approches de conjugaison .....	74
III.2	Impact du complexe sur le vecteur .....	75
III.3	Stabilité des complexes de cuivre-64 in vivo.....	76
III.3.1	Résistance à la transchélation .....	76
III.3.2	Résistance à la réduction .....	78
III.3.3	Résistance à la transmétallation.....	79
IV	Etat de l'art des ligands dédiés au cuivre .....	79
IV.1	Ligands acycliques (aliphatiques).....	79
IV.1.1	Les poly(amino carboxylates) acycliques.....	79
IV.1.2	Les bis(thiosemicarbazones) .....	79
IV.1.3	Dérivés de la bispidine.....	80
IV.1.4	Dérivés triaminocyclohexanes .....	80
IV.2	Ligands mono-macrocycliques.....	82
IV.2.1	Dérivés carboxylates du cyclen, cyclam et tacn .....	82
IV.3	Ligands macrobicycliques .....	84
IV.3.1	Dérivés pontés du cyclen et du cyclam.....	85
IV.3.2	Sarcophagines .....	85
	<b>Développements cliniques de l'imagerie phénotypique au Cu-64 .....</b>	<b>88</b>
	<b>Conclusion.....</b>	<b>91</b>
	<b>Partie II : Développement d'un nouveau ligand macrocyclique tetraazoté</b>	
	<b>spécifique du cuivre.....</b>	<b>93</b>
	<b>Présentation des ligands fonctionnalisés picolinate(s) .....</b>	<b>94</b>

<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>97</b>
I Synthèse du TE1PA.....	97
II Radiomarquage/radiochimie.....	98
II.1 Réactifs et instrumentation.....	98
II.2 Analyses chromatographiques .....	99
II.3 Radiomarquage des ligands .....	100
III Etude de stabilité in vitro.....	101
IV Etudes de stabilité in vivo .....	101
IV.1 Biodistributions et pharmacocinétiques.....	101
IV.2 Métabolisme .....	103
V Analyse statistique.....	103
<b>Résultats .....</b>	<b>104</b>
I Synthèse du TE1PA.....	104
I.1 Voie cyclam diformyle .....	104
I.2 Voie cyclam phosphoryle .....	104
II Radiomarquage des ligands.....	104
III Etude de stabilité <i>in vitro</i> .....	105
IV Etudes de stabilité in vivo .....	107
IV.1 Biodistributions et pharmacocinétiques.....	107
IV.2 Métabolisme .....	110
<b>Discussion .....</b>	<b>113</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>116</b>
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>117</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>118</b>
<b>Annexe 1 : Article soumis au "Journal of nuclear medicine &amp; biology" en octobre 2013</b>	
<b>(NUCMEDBIO-D-13-00276).....</b>	<b>118</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>138</b>

## Liste des figures

---

<u>Figure 1.</u> Principe physique de détection en TEP : annihilation du positon et émission de photons en coïncidence pouvant interagir avec la couronne de détecteurs. (4).....	16
<u>Figure 2.</u> Représentation schématique d'une vraie coïncidence, de l'atténuation et des différentes coïncidences parasites rencontrées en TEP : Coïncidence liée à la diffusion, vraie coïncidence parasite, coïncidence fortuite. (4).....	17
<u>Figure 3.</u> Représentations schématiques d'un anticorps entier et des différents fragments d'anticorps obtenus par biologie moléculaire. (21) .....	28
<u>Figure 4.</u> Minibody obtenu par dimérisation non covalente de scFv-C <sub>H</sub> 3 et minibody FLEX. (56).....	30
<u>Figure 5.</u> Structure d'un anticorps humain et d'un anticorps de camélidé. (66).....	32
<u>Figure 6.</u> Principe de la radioimmunothérapie préciblée par le système AES (Affinity Enhancement System) .....	36
<u>Figure 7.</u> Schéma de désintégration du cuivre-64.....	41
<u>Figure 8.</u> Réaction de complexation mise en jeu pour la détermination de l'activité spécifique effective lors du dosage avec le ligand macrocyclique tetraazoté TETA. ....	44
<u>Figure 9.</u> : Section efficace de production en fonction de l'énergie incidente des particules pour la réaction $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ . (102) .....	45
<u>Figure 10.</u> Profil de séparation du Ni, Co et Cu, élués par des concentrations décroissantes d'acide chlorhydrique sur résine échangeuse d'anions. (101).....	47
<u>Figure 11.</u> Section efficace de production en fonction de l'énergie incidente des particules pour la réaction $^{64}\text{Ni}(d,2n)^{64}\text{Cu}$ . (102).....	48
<u>Figure 12.</u> Temps d'électrodéposition en fonction de l'épaisseur du dépôt de nickel. ....	51
<u>Figure 13.</u> Dépôt de $^{64}\text{Ni}$ de 14 cm <sup>2</sup> sur un support de cible en or (11,9cm x 5cm x 3cm) et grossi à x 120 au microscope optique. ....	52
<u>Figure 14.</u> Cible permettant la production de $^{64}\text{Cu}$ à ARRONAX, accompagnée de son dispositif de refroidissement et de transport pneumatique (navette).....	52
<u>Figure 15.</u> Profil d'éluion obtenu avec la résine AG1x8 lors de la purification du $^{64}\text{Cu}$ avec la méthode développée à ARRONAX.....	53
<u>Figure 16.</u> Exemple de spectre gamma obtenu par spectrométrie HPGe lors de l'identification du $^{64}\text{Cu}$ et du contrôle de la pureté radionucléidique de la solution de $^{64}\text{CuCl}_2$ . ....	55



<u>Figure 17.</u> Importation et métabolisme du cuivre dans une cellule mammifère type. ....	59
<u>Figure 18.</u> Localisation membranaire des transporteurs du cuivre et direction des flux au niveau de différents types cellulaires : cellule du plexus choroïde (SNC), hépatocyte (foie), cellule du tubule proximal (rein), entérocyte (intestin). (114).....	62
<u>Figure 19.</u> Fonctions de couplage les plus courantes.....	73
<u>Figure 20.</u> Structure d'un anticorps entier (IgG) et répartition des lysines. (132) .....	76
<u>Figure 21.</u> Ligands acycliques du cuivre : EDTA ; DTPA ; bis(thiosemicarbazones) ; dérivés bispidine ; tachpyr et IM.....	81
<u>Figure 22.</u> Ligands macrocycliques tetraazotés dérivés du cyclam, cyclen et tacn.....	84
<u>Figure 23.</u> Ligands macrobicycliques tetra et hexaazotés.....	87
<u>Figure 24.</u> Structure de HTE1PA et HDO1PA : ligands monopicolinates dérivés du cyclam et du cyclen.....	94
<u>Figure 25.</u> Diagramme de spéciation du Cu(II) en présence d'HTE1PA (L2). $[Cu^{2+}]_{tot} = [L]_{tot} = 10^{-3}$ M. (186) .....	95
<u>Figure 26.</u> Structure tridimensionnelle du complexe [Cu]TE1PA.....	96
<u>Figure 27.</u> Voies de synthèse du TE1PA .....	98
<u>Figure 28.</u> Profils de chromatographie d'exclusion stérique des échantillons de serum incubés avec le $[^{64}Cu]TE1PA$ à 4°C ou à 37°C comparés aux profils du sérum contrôle ( $[^{64}Cu]$ acétate incubé dans le sérum) et de la solution de radiomarquage du $[^{64}Cu]TE1PA$ .....	105
<u>Figure 29.</u> Radiochromatogrammes CCM des solutions de marquage du $[^{64}Cu]TE1PA$ , $[^{64}Cu]$ acetate, $[^{64}Cu]$ DOTA et du sérum incubé avec le $[^{64}Cu]TE1PA$ à 37°C (à 24 h).....	106
<u>Figure 30.</u> Chromatogramme CLHP de la solution de $[^{64}Cu]$ acétate ; de la solution de marquage du $[^{64}Cu]TE1PA$ ; du serum incubé avec le $[^{64}Cu]TE1PA$ à 37°C pendant 24 h, après précipitation des protéines.....	107
<u>Figure 31.</u> Biodistribution du $[^{64}Cu]$ acétate chez la souris BALB/c à 2h et 24 h après injection de 3,3-3,6 MBq.....	108
<u>Figure 32.</u> Biodistribution du $[^{64}Cu]TE1PA$ et du $[^{64}Cu]$ DOTA chez la souris BALB/c à 2h et 24 h après injection de 3,3-3,6 MBq.....	109
<u>Figure 33.</u> Chromatogrammes CLHP (exclusion stérique) de la solution de $[^{64}Cu]$ SOD et des extraits de foie des souris injectées avec 3,3-3,6 MBq de $[^{64}Cu]$ acetate, $[^{64}Cu]TE1PA$ ou $[^{64}Cu]$ DOTA et sacrifiées à 2 h après injection.....	111
<u>Figure 34.</u> Radiochromatogrammes CCM de la solution de marquage du $[^{64}Cu]TE1PA$ et de l'extrait de foie (à 2 h après injection) d'une souris injectée avec 3,3-3,6 MBq de $[^{64}Cu]TE1PA$ .....	111

## Liste des tableaux

---

<u>Tableau 1.</u> Spécialités ayant été autorisées pour la radioimmunoscintigraphie en oncologie.....	20
<u>Tableau 2.</u> Biomarqueurs ayant été utilisés en imagerie phénotypique-TEP.....	24
<u>Tableau 3.</u> Principales caractéristiques des vecteurs (anticorps, fragments d'anticorps, structures apparentées ou non apparentées aux immunoglobulines) pouvant être utilisés en imagerie phénotypique-TEP.....	34
<u>Tableau 4.</u> Caractéristiques physiques des radionucléides émetteurs de positons pouvant être utilisés en imagerie phénotypique-TEP.....	38
<u>Tableau 5.</u> Récapitulatif des avantages et inconvénients des matériaux pouvant être utilisés comme support de cible pour la production de $^{64}\text{Cu}$ à partir du $^{64}\text{Ni}$ .....	46
<u>Tableau 6.</u> Rendements théoriques de production du $^{64}\text{Cu}$ pour les réactions $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ et $^{64}\text{Ni}(d,2n)^{64}\text{Cu}$ .....	48
<u>Tableau 7.</u> Caractéristiques des différents faisceaux de particules accélérées disponibles au cyclotron ARRONAX.....	50
<u>Tableau 8.</u> Fonctions biologiques et conséquences des anomalies d'expression des principales cuproprotéines de l'organisme. (111).....	57
<u>Tableau 9.</u> Paramètres chimiques des complexes de cuivre formés par le DOTA, le TETA et le NOTA.....	82
<u>Tableau 10.</u> Etat des lieux des essais cliniques d'imagerie phénotypique au cuivre-64.....	90
<u>Tableau 11.</u> Répartition et effectifs des animaux dans chacun des groupes d'étude in vivo.....	102

## Liste des abbréviations

---

%DI/g	Pourcentage de Dose Injectée par gramme
AES	Affinity Enhancement System
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ARRONAX	Accélérateur pour la Recherche en Radiochimie et Oncologie de Nantes Atlantique
ATP	Adénosine Triphosphate
ATU	Autorisation Temporaire d'Utilisation
BFA	Agent (chélatant) Bifonctionnel
BFC	Chélatant Bifonctionnel
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CCO	Cytochrome C Oxydase
CCS	Chaperonne du Cuivre pour la Superoxyde dismutase
CEEA	Comité Ethique d'Expérimentation Animale
CHU	Centre Hospitalo-Universitaire
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Pression
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
CPPC	Cancer Pulmonaire à Petites Cellules
CRCNA	Centre de Recherche en Cancérologie de Nantes-Angers
DARPinS	[en anglais] Designed Ankyrin Repeat Proteins
DCI	Dénomination commune internationale
ENH	Electrode Normale à Hydrogène
FDG	2-desoxy-2-[ <sup>18</sup> F]fluoro-D-glucose
FISH	Fluorescence par Hybridation In Situ
FLT	3'-[ <sup>18</sup> F]fluoro-3'-deoxythymidine
GMP	Bonnes Pratiques de Fabrication
GSH	Glutathion
HPGe	(détecteur) Germanium Haute Performance
HSAB	[en anglais] Hard and Soft Acid and Basis
ICP-MS	Spectrométrie de Masse par torche à Plasma

ICP-OES	Spectrométrie d'Emission Atomique par torche à Plasma
Ig	Immunoglobuline(s)
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LNH	Lymphome Non Hodgkinien
mAb	Anticorps monoclon(al)(aux)
MTs	Métallothionéines
MURR	Réacteur de Recherche de l'Université du Missouri
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NHS	N-hydroxysuccinimide
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
RIS	Radioimmunosciintigraphie
RIT	Radioimmunothérapie
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SNC	Système Nerveux Central
SOD	Superoxyde Dismutase
TA	Température Ambiante
TEMP	Tomographie par Emission Monophotonique
TEP	Tomographie par Emission de Positons
UMR	Unité Mobile de Recherche

# Préambule

Le cancer est un des problèmes majeurs de santé publique du XXI<sup>ème</sup> siècle. Il s'agit d'une pathologie caractérisée par la présence d'une ou de plusieurs tumeur(s) maligne(s) issues de la mutation ou d'anomalies cytogénétiques d'une cellule initialement saine et devenant anormale notamment suite à la perte de contrôle du cycle cellulaire et de la sensibilité à l'apoptose ainsi qu'à des anomalies de la réparation de l'ADN. Le développement de la tumeur repose sur la prolifération clonale des cellules anormales dont la croissance s'étend au-delà de leurs limites physiologiques et qui peuvent alors envahir des zones voisines de l'organisme puis essaimer dans d'autres organes. Ce processus est connu sous le terme de dissémination métastatique et constitue la principale cause de décès par cancer. En 2008, le cancer était à l'origine de 7,6 millions de décès dans le monde, soit près de 13% de la mortalité mondiale (1).

En France métropolitaine, pour l'année 2011, le nombre de nouveaux diagnostics de cancer est estimé à 365 500 pour l'ensemble de la population, respectivement 207 000 hommes et 158 500 femmes. Le cancer de la prostate est de loin le cancer le plus fréquent chez l'homme (71000 cas), devant le cancer du poumon puis le cancer colorectal. Chez la femme, le cancer le plus fréquent est le cancer du sein (53000 cas), devant le cancer colorectal puis le cancer du poumon.

Le cancer est la première cause de mortalité chez l'homme et la seconde chez la femme avec respectivement 33 % et 24 % de l'ensemble des décès. On estime à 147 500 le nombre de décès par cancer en 2011 dont 84 500 chez l'homme et 63 000 chez la femme. Chez l'homme, le cancer du poumon est la principale cause de décès par cancer (21 000 décès), suivi par les cancers du côlon-rectum et de la prostate. Chez la femme, il s'agit du cancer du sein (11 500 décès) suivi par les cancers du côlon-rectum et du poumon. En considérant l'ensemble des cancers, on constate ces dernières années une augmentation de l'incidence mais une baisse de la mortalité (2). La prise en charge des cancers est de fait de plus en plus efficace. Celle-ci repose sur des approches multiples : de chirurgie, de radiothérapie et de chimiothérapie. En ce qui concerne la chimiothérapie, près de quarante nouvelles molécules ont été mises sur le marché au cours des neuf dernières années dont 42 % sont des thérapies ciblées (2). Ces dernières ont permis d'améliorer considérablement le pronostic d'un certain nombre de cancers. Leurs modes d'actions reposent sur une interaction directe avec les mécanismes de l'oncogénèse, avec une spécificité importante pour les cellules cancéreuses, d'où le terme de « thérapie ciblée ». Les anticorps monoclonaux représentent une part importante de ces nouveaux traitements. Ils sont spécifiques d'une cible tumorale et permettent soit de bloquer la liaison de ligands endogènes à

un récepteur surexprimé, soit d'inhiber l'activation de voies de signalisation ou encore de jouer le rôle de médiateurs de la cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante (ADCC). Etant donné que leur effet cytotoxique repose sur un ciblage antigénique très spécifique, la connaissance du phénotype tumoral, c'est-à-dire l'identification de la cible, constitue un prérequis indispensable à l'instauration du traitement. Actuellement, cette identification est réalisée par des techniques anatomo-pathologiques après un prélèvement par biopsie. Cette approche n'est cependant pas sans risques ni inconvénients. Par conséquent, il existe un besoin réel d'accéder au statut phénotypique tumoral à l'aide de nouvelles modalités diagnostiques. Dans ce contexte, les techniques d'imagerie constituent une alternative de choix à même d'établir une cartographie de l'expression phénotypique à l'échelle du corps entier. La technique la plus adaptée est l'imagerie phénotypique-TEP ; elle a pour application non seulement la sélection des patients éligibles à une thérapie ciblée mais également l'évaluation de la réponse à ce type de traitement ou encore le diagnostic de lésions tumorales primitives ou métastatiques. En tant que modalité d'imagerie nucléaire TEP, l'imagerie phénotypique-TEP repose sur l'utilisation d'un vecteur marqué à l'aide d'un radionucléide, en l'occurrence émetteur de positons. Parmi les candidats radionucléides, le cuivre-64 est une des meilleures alternatives actuelles. Son utilisation nécessite cependant de disposer de ligands assurant un radiomarquage sûr et efficace du vecteur, de telle sorte que les radiopharmaceutiques marqués au cuivre-64 puissent être utilisés en routine clinique. Le but de ce travail est d'établir le rationnel des marquages au cuivre-64 puis de présenter le développement d'un ligand pour l'imagerie phénotypique-TEP au cuivre-64, en cancérologie.

Ce travail s'articule en deux grandes parties :

- La première partie présente des généralités à propos de l'imagerie phénotypique-TEP, le cuivre-64, le métabolisme du cuivre, la complexation du cuivre et les marquages au cuivre-64 ainsi que les développements cliniques de l'imagerie phénotypique-TEP au cuivre-64.
- La deuxième partie présente un travail expérimental consacré au développement d'un nouveau ligand macrocyclique tetraazoté pour l'imagerie phénotypique-TEP au cuivre-64. Ce travail a été réalisé au sein de l'unité mixte de recherche INSERM 892 (équipe 13) du Centre de Recherches en Cancérologie de Nantes-Angers et a été soumis à publication dans la revue « Journal of Nuclear Medicine and Biology ».

# **Partie I : Généralités**

# **L'imagerie phénotypique-TEP**

---

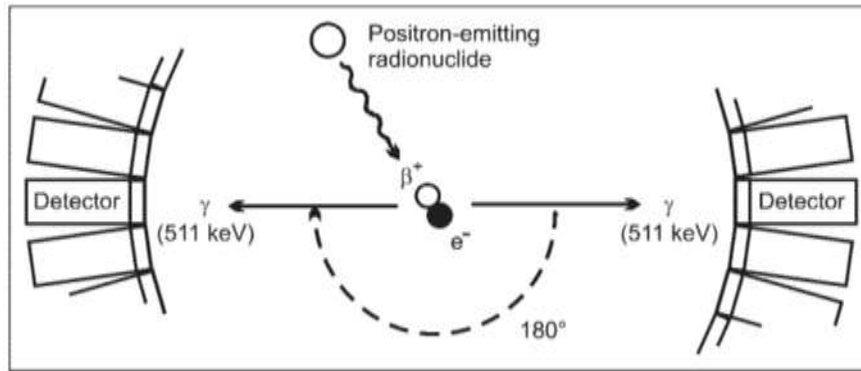
## **I Définition**

L'imagerie phénotypique-TEP, aussi appelée immuno-TEP (immuno-PET est le terme généralement consacré en anglais), est une modalité d'imagerie nucléaire basée sur l'utilisation de biomolécules (vecteurs) capables de reconnaître spécifiquement un antigène donné, marquées avec un radionucléide émetteur de positons. Les vecteurs classiquement utilisés sont des anticorps monoclonaux (mAb) ou des fragments de mAb. En cancérologie, la spécificité de reconnaissance de ces vecteurs est mise à profit pour atteindre une cible tumorale ou associée à son environnement. L'antigène ainsi ciblé peut être un récepteur de facteur de croissance, un produit d'oncogène ou de gène « suppresseur de tumeur » muté (3). La finalité, en tant que modalité d'imagerie, est de réaliser une image basée sur l'expression phénotypique des tumeurs plutôt que sur leur activité métabolique (TEP-FDG par ex.) ou leur morphologie (tomographie par rayons X ou par résonance magnétique).

## **II Tomographie par émission de positons**

La tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie fonctionnelle dont le principe de détection mis en jeu repose sur une singularité physique liée à l'interaction des positons (particules  $\beta^+$ ) dans la matière. Suite à la désintégration d'un radionucléide émetteur de positons, le positon va parcourir une distance de quelques millimètres dans la matière, dépendamment de son énergie initiale et de la densité du milieu environnant. Après avoir perdu l'intégralité de son énergie cinétique par excitation et ionisation de la matière, le positon va se combiner avec un électron. Il s'en suit un phénomène d'annihilation où l'énergie correspondant à la masse au repos de ces deux particules conduit à l'émission simultanée et dans des directions opposées de deux photons ayant chacun une énergie de 511 keV.





*Figure 1. Principe physique de détection en TEP : annihilation du positon et émission de photons en coïncidence pouvant interagir avec la couronne de détecteurs. (4)*

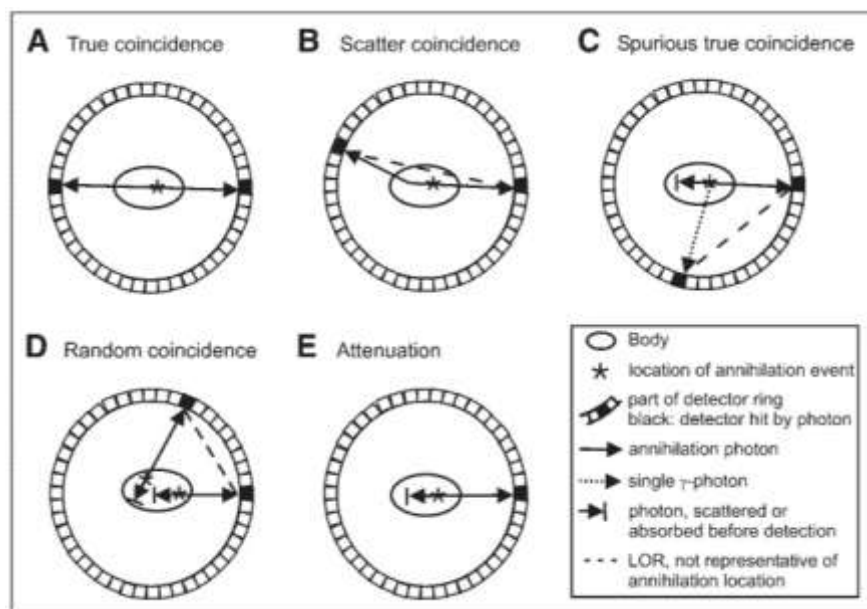
La distribution dans l'organisme d'un traceur radiomarqué avec un émetteur de positons peut être suivie à l'aide d'une caméra TEP. Celle-ci est capable de détecter les paires de photons d'annihilation émises en coïncidence à l'aide d'une couronne de détecteurs placée autour du patient. Si deux photons sont enregistrés par des détecteurs rigoureusement opposés dans un intervalle de temps de l'ordre de 5 à 15 nanosecondes, l'appareil considère qu'une annihilation a eu lieu en un point de la droite reliant ces deux détecteurs. En calculant l'intersection de l'ensemble des droites enregistrées au cours de l'acquisition, il est possible de déterminer la localisation dans l'espace du foyer d'émission et de reconstituer une image tomographique.

La première caméra TEP développée en 1975 (5) était équipée de détecteurs constitués de cristaux scintillants à base d'iodure de sodium dopé au thallium (NaI[Tl]) et disposés en hexagone. Depuis, de nombreuses améliorations ont été apportées, notamment en ce qui concerne les matériaux utilisés pour les cristaux scintillants. Ces derniers sont actuellement en germanate de bismuth (BGO) et sont caractérisés par une meilleure efficacité de détection des photons de 511 keV. La disposition des détecteurs a par ailleurs rapidement évoluée vers une disposition octogonale puis circulaire.

Dans le cadre de l'imagerie phénotypique-TEP, il est particulièrement intéressant de pouvoir quantifier avec précision la radioactivité fixée *in vivo* dans un volume donné. Ceci est possible à condition d'appliquer aux informations brutes des algorithmes de correction adaptés. Il est en effet nécessaire de faire la distinction entre les coïncidences vraies et les coïncidences parasites qui peuvent être soit de nature purement fortuite ou liées à la diffusion ou encore être de vraies coïncidences parasites (voir figure 2). Dans ce dernier cas, il s'agit de l'enregistrement d'un photon d'annihilation simultanément à un photon gamma provenant de la même désintégration et ayant une énergie comprise dans la fenêtre d'énergie utilisée pour l'acquisition (généralement 350-650 keV). Le choix du radionucléide utilisé peut permettre d'éliminer ce type de coïncidence (cf. VI p. 37-40).

Par ailleurs, les caméras TEP actuelles sont couplées avec un tomographe à rayons X (TEP-scan), voire avec un système d'imagerie par résonance magnétique (TEP-IRM), ce qui permet de fusionner facilement les images biologiques (phénotypique par ex.) et anatomiques. Au delà de l'avantage apporté en terme d'interprétation de l'examen, ce couplage permet également de réaliser une correction d'atténuation, c'est à dire de tenir compte de la perte d'informations liée à l'interaction de l'un ou des deux photons d'annihilation dans l'organisme, que ce soit par diffusion Compton ou par effet photoélectrique.

Au final, la TEP est dix fois plus sensible que l'imagerie nucléaire conventionnelle par tomographie d'émission monophotonique (TEMP). Elle permet ainsi de détecter de très faibles quantités, de l'ordre de 100 nmol à 1 pmol. De plus, sa résolution (3-9 mm<sup>3</sup>) permet de visualiser fidèlement des tumeurs de très petite taille (6).



*LOR : ligne de réponse (non représentative de la localisation réelle de l'annihilation dans le cadre de ces coïncidences parasites).*

*Figure 2. Représentation schématique d'une vraie coïncidence (A), de l'atténuation (E) et des différentes coïncidences parasites rencontrées en TEP : Coïncidence liée à la diffusion (B), vraie coïncidence parasite (C), coïncidence fortuite (D). (4)*

### III Intérêt scientifique et médical

#### III.1 Intérêt diagnostique

L'imagerie métabolique TEP occupe actuellement une place décisive dans la prise en charge des cancers, tout particulièrement depuis la commercialisation du 2-desoxy-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-D-glucose (FDG) en 1998 (AMM du Flucis®). L'imagerie TEP-FDG couplée à la tomographie par rayons X (TEP-Scan-FDG) est en effet devenue la méthode de référence pour la stadification, l'évaluation de la réponse thérapeutique et le suivi post-chimiothérapie. Sa sensibilité moyenne en oncologie est estimée à 84%, sa spécificité à 88% et sa résolution est de l'ordre de quelques millimètres (7). En comparaison des techniques d'imageries classiques morphologiques, elle permet la quantification du processus tumoral, la détection de tumeurs de faible volume, la stadification corps entier et la différenciation du tissu malin versus le tissu cicatriciel ou nécrotique. Le FDG est un traceur non spécifique, il permet de visualiser le métabolisme glucidique cellulaire et *a fortiori* celui des tumeurs agressives sujettes à un hypermétabolisme énergétique, entraînant la régulation positive de l'hexokinase par effet Warburg. En raison de cette non spécificité, le FDG est susceptible de s'accumuler au niveau de lésions non cancéreuses ayant un métabolisme accru, notamment des processus inflammatoires, conduisant à un manque de spécificité dans certaines situations cliniques, comme le myélome multiple (8).

Par ailleurs, certains types de tumeurs ne présentent pas d'augmentation significative de leur activité métabolique et de ce fait ne fixent peu ou pas le FDG. C'est notamment le cas du cancer de la prostate, des tumeurs neuroendocrines (9), du myélome multiple (10) et du carcinome des cellules rénales. Dans ce dernier cas, 25 % des lésions métastatiques ne fixent pas le FDG (11).

Pour pallier les lacunes de l'imagerie métabolique TEP, d'autres radiopharmaceutiques émetteurs de positons ont été développés : La [<sup>18</sup>F]-FDOPA pour l'imagerie des tumeurs neuroendocrines (cancers médullaires de la thyroïde, insulinome, paragangliomes, phéochromocytomes, tumeurs carcinoïdes bien différenciées du tube digestif) (12); la [<sup>18</sup>F]-Fcholine dans les cancers hépatocellulaires et de la prostate (13); la 3'-[<sup>18</sup>F]fluoro-3'-deoxythymidine ([<sup>18</sup>F]-FLT), marqueur de la prolifération cellulaire, dans les gliomes, le cancer colorectal et le lymphome (14,15). A noter que la [<sup>18</sup>F]-FDOPA et la [<sup>18</sup>F]-Fcholine possèdent une autorisation de mise sur le marché (AMM) respectivement depuis 2006 (IASODOPA®) et 2010 (IASOCHOLINE®). En revanche, aucun nouveau radiopharmaceutique n'a montré de réels progrès dans le diagnostic et le suivi du myélome multiple ou du carcinome des cellules rénales. C'est dans ce contexte que s'inscrit l'intérêt diagnostique de l'imagerie phénotypique-PET. Le ciblage tumoral assuré par un vecteur tel qu'un mAb n'est en effet pas influencé par le statut

métabolique de la cellule tumorale et permet la visualisation d'envahissements diffus. L'imagerie phénotypique est ainsi en mesure d'apporter des informations diagnostiques pertinentes dans les situations où le FDG est en défaut.

### ***III.2 Intérêt par rapport à la radioimmunoscintigraphie TEMP dans les indications oncologiques***

Avant l'essor de la technologie TEP et la multiplication des caméras dédiées, de nombreuses spécialités radiopharmaceutiques ont été mises sur le marché pour réaliser de la radioimmunoscintigraphie (RIS) par TEMP. La plupart de ces spécialités sont à base de fragments d'anticorps, voire d'anticorps entiers, modifiés pour être radiomarqués avec des radionucléides émetteurs gamma : le  $^{99m}\text{Tc}$  ou le  $^{111}\text{In}$  (voir tableau 1). Les trois spécialités ayant obtenu une AMM en France - retirées dans l'intervalle - avaient toutes une indication pour la stadification chez des patients suspectés d'une récurrence de la pathologie tumorale ou d'une évolution métastatique :

- Le CEA Scan® pour le diagnostic chez les patients atteints de cancer du côlon ou du rectum confirmé par histologie, afin de mettre en évidence une récurrence tumorale et/ou des métastases
- L'OncoScint CR 103® pour détecter et préciser l'extension d'une lésion maligne chez des malades présentant un cancer colorectal confirmé ou une forte suspicion clinique de récurrence d'un cancer colorectal ou ovarien
- L'INDIMACIS 125® dans le diagnostic positif des récurrences d'adénocarcinome ovarien lorsque le taux d'antigène CA 125 sérique est augmenté et lorsque l'échographie ou la tomодensitométrie sont négatives.

Bien que les images obtenues à l'aide de ces traceurs soient relativement informatives, les tumeurs apparaissaient nettement plus grandes que leur taille réelle, en raison de la moins bonne résolution de l'imagerie TEMP (16) (17) (18). De plus, la TEMP ne permettait pas une quantification précise de la radioactivité et manquait de sensibilité pour détecter des tumeurs de petite taille. Par ailleurs, les images phénotypiques obtenues n'étaient pas associées aux images anatomiques puisque les gamma caméras utilisées n'étaient pas encore couplées à la tomographie par rayons X (19). Au final, l'examen ne permettait pas d'obtenir d'informations suffisamment précises quant à la localisation des tumeurs, notamment pour guider une intervention chirurgicale (20).

DCI (nom commercial)	Titulaire de l'AMM	Retrait du marché français	Antigène ciblé	Structure	Marquage	Indication diagnostique (localisation)
Arcitumomab (CEA SCAN)	Immunomedics	2005	ACE	IgG1 Fab'	<sup>99m</sup> Tc	Colorectal
Bectumomab (LYMPHOSCAN)	Immunomedics	NC, retiré	CD22	IgG2a Fab'	<sup>99m</sup> Tc	LNH
Capromab pendetide (PROSTASCINT)	Cytogen	NC	PSMA	IgG1	<sup>111</sup> In	Prostate
Igovomab (INDIMACIS 125)	CIS Bio International	2009	CA-125	IgG1 F(ab')2	<sup>111</sup> In	Ovaire
Nofetumomab merpentan (VERLUMA)	Boehringer Ingelheim	NC	EpCAM	IgG2b Fab'	<sup>99m</sup> Tc	CPPC
Satumomab pendetide (ONCOSCINT CR 103)	CIS Bio International	2003	TAG-72	IgG1	<sup>111</sup> In	Colorectal et ovaire
Votumumab (HUMASPECT)	Intracel	NC	Cytokératine altérées	IgG3	<sup>99m</sup> Tc	Colorectal, ovaire, sein

*D'après (21–24)*

*ACE (antigène carcino-embryonnaire), CPPC (cancer du poumon à petites cellules), LNH (lymphome non hogklinien), PSMA (antigène membranaire spécifique de la prostate), TAG-72 (glycoprotéine-72 associée aux tumeurs), NC (non commercialisé en France).*

*Tableau 1. Spécialités ayant été autorisées pour la radioimmunoscintigraphie en cancérologie.*

A noter que les spécialités citées plus haut ont été retirées à la demande des laboratoires les commercialisant, preuve que le succès médical et commercial n'était pas probant. L'avènement de la TEP-Scan-FDG dans les années 2000 explique également la perte d'intérêt pour ces radiopharmaceutiques (25) (26).

La combinaison d'une plus grande sensibilité, d'une meilleure résolution, d'une quantification plus précise et de la fusion des images scintigraphiques aux images morphologiques, apportée par l'imagerie TEP, explique que l'imagerie phénotypique apparaît à nouveau comme une modalité d'imagerie séduisante, avec de nouvelles contributions possibles dans le diagnostic et le suivi clinique des patients.

### **III.3 Intérêt dans le choix et l'évaluation de la réponse au traitement**

Les récentes avancées thérapeutiques dans le domaine de la cancérologie sont en grande partie liées à l'apparition des nouvelles thérapies ciblées ayant pour principe actif des mAb. Bien que le gain apporté par ces nouveaux traitements soit indéniable, leur coût pour la société est très important, d'autant que les nouvelles spécialités issues de la biotechnologie sont de plus en plus nombreuses (27) (28). Il se pose donc la question de la sélection des patients ayant les plus grandes chances de tirer un maximum de bénéfices de ces thérapies.

Actuellement, ceci est réalisé par analyse anatomo-pathologique afin de confirmer l'expression de l'antigène ciblé par l'anticorps thérapeutique. Par exemple, les patientes avec un cancer du sein métastatique sont uniquement éligibles pour un traitement à base de trastuzumab (HERCEPTIN®) - un mAb ciblant le facteur de croissance HER-2 - lorsqu'il a pu être démontré par immunohistochimie que les cellules tumorales présentent une hyper-expression de cet antigène ou, par technique de fluorescence par hybridation in situ (FISH), qu'il existe une amplification du gène codant pour HER-2. Le principal inconvénient de cette méthode de sélection est qu'elle ne reflète l'expression de l'antigène d'intérêt qu'au niveau de l'unique biopsie réalisée. Il est en effet possible que le degré d'expression d'HER-2 soit différent entre la tumeur primaire et les métastases ou que celui-ci varie au cours de la maladie, en particulier au cours de la chimiothérapie ou de l'hormonothérapie (29). Pour autant, la réalisation de plusieurs biopsies ne permettrait pas nécessairement d'avoir une information plus fiable, en raison de l'hétérogénéité des lésions cancéreuses ainsi que de leur difficulté d'accès, sans compter la nature invasive de l'acte pouvant notamment engendrer l'éfraction de la tumeur et favoriser la dissémination métastatique.

L'exemple du trastuzumab éclaire le fait que l'imagerie phénotypique-TEP constitue une technique de choix pour la sélection des patients et l'évaluation de la réponse aux thérapies ciblées. L'imagerie phénotypique-TEP rassemble en effet de nombreux avantages puisqu'il s'agit d'une technique permettant d'obtenir une cartographie de l'ensemble des zones tumorales exprimant la cible thérapeutique, ce de manière atraumatique, quantitative et au cours du temps. Ces informations sont également particulièrement intéressantes dans le cadre de protocoles combinant une thérapie ciblée avec d'autres modalités thérapeutiques (chimiothérapie et/ou radiothérapie) afin d'obtenir une meilleure synergie via un plan de traitement personnalisé.

### **III.4 Intérêt dans le développement de nouveaux traitements**

L'imagerie phénotypique-TEP est également particulièrement intéressante lors des différentes phases de développement clinique de nouveaux anticorps thérapeutiques. Sa capacité de quantification très précise permet en effet d'apporter des informations précieuses pour déterminer la posologie optimale, notamment en déterminant la dose minimale nécessaire pour saturer les récepteurs ciblés. Elle est également à même d'évaluer les variations de la fixation tumorale et de la pharmacocinétique inter-patients, ainsi que d'identifier les organes sains ciblés par l'anticorps afin d'anticiper la toxicité du traitement, grâce à l'imagerie corps entier.

L'ensemble de ces informations est recueilli de manière précise et minimalement invasive et permet de diminuer le nombre de patients traités de manière suboptimale, en particulier lors du développement d'anticorps dirigés contre de nouvelles cibles thérapeutiques pour lesquelles on dispose de très peu de recul (30).

### **III.5 Intérêt en lien avec la radioimmunothérapie**

La radioimmunothérapie (RIT) constitue le versant thérapeutique de l'utilisation des immunoconjugués en médecine nucléaire. Les anticorps se sont révélés être des vecteurs de choix pour délivrer une irradiation très localisée, directement au contact de la tumeur. La RIT est d'ailleurs aussi désignée sous le terme de radiothérapie interne vectorisée par opposition à la radiothérapie externe qui fait déjà partie de l'arsenal thérapeutique en cancérologie. Les radionucléides classiquement utilisés dans le cadre de la RIT sont des émetteurs de particules  $\beta^-$ , tel que l' $^{131}\text{I}$  ( $T_{1/2}=8$  j.), l' $^{90}\text{Y}$  ( $T_{1/2}=2,7$  j.) ou encore le  $^{177}\text{Lu}$  ( $T_{1/2}=6,7$  j.), caractérisés par des périodes radioactives de plusieurs jours et ayant une énergie maximale allant de 498 keV pour le  $^{177}\text{Lu}$  à 2,3 MeV pour l' $^{90}\text{Y}$ , d'où la possibilité de sélectionner le radionucléide le plus adapté en fonction de la taille des tumeurs à irradier. A noter que l'utilisation de radionucléides émetteurs de particules alpha, très énergétiques et peu pénétrantes, fait l'objet de travaux précliniques et cliniques afin d'améliorer la cytotoxicité de la RIT (31). A l'heure actuelle, la RIT est proposée dans des contextes de tumeurs minimales, en présence de masses résiduelles, ou en traitement adjuvant. Son efficacité n'a cependant pu être clairement démontrée que dans les lymphomes. C'est d'ailleurs pour cette indication que le ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan) a obtenu son AMM en 2004; il demeure le seul immunoconjugué commercialisé en France pour la RIT, après radiomarquage avec l' $^{90}\text{Y}$ .

A l'avenir, l'intérêt de la RIT sera peut-être reconnu pour traiter d'autres hémopathies malignes. Elle a en revanche « peu de chances de venir à bout de cancers avancés lorsque les masses tumorales sont importantes » (3).

La RIT peut avantageusement tirer profit de l'imagerie phénotypique. Cette dernière permet en effet de confirmer et de quantifier le ciblage tumoral et d'évaluer avec précision la dose délivrée à la tumeur ainsi qu'aux tissus sains.

Ces informations sont particulièrement importantes, pour sélectionner les patients éligibles pour la RIT mais surtout pour ajuster le plus finement possible l'activité thérapeutique injectée. La RIT est en effet limitée par une fenêtre thérapeutique très étroite avec comme principal organe critique la moelle osseuse et une toxicité hématologique dose dépendante (4).

A l'instar de la radio-immunoscintigraphie diagnostique, l'imagerie phénotypique - en tant qu'examen préalable à la RIT - a d'abord été développée avec des radionucléides émetteurs gamma. La majorité des études ont été réalisées avec les couples  $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}$  ou  $^{111}\text{In}/^{177}\text{Lu}$  (32-38). Des différences de fixation ont cependant été observées entre le volet imagerie et le volet thérapeutique, malgré l'utilisation du même couple anticorps-chélatant (DTPA, tiuxetan ou DOTA) (39). De ce point de vue, le développement de l'imagerie phénotypique-TEP bénéficie dans le cadre de la RIT d'un autre avantage. Il existe en effet des couples de radionucléides émetteurs  $\beta^+/\beta^-$  dont les propriétés physiques permettent d'envisager une imagerie phénotypique par TEP et une RIT  $\beta^-$  avec des isotopes d'un même élément chimique. Ces couples sont : le  $^{64}\text{Cu}/^{67}\text{Cu}$ , l' $^{86}\text{Y}/^{90}\text{Y}$ , et l' $^{124}\text{I}/^{131}\text{I}$  (4)(40).

#### **IV Choix de l'antigène**

Les avancées récentes dans la compréhension et l'analyse du génome humain, de l'épigénome, du transcriptome, du protéome et du métabolome ont conduit à une révolution dans la découverte des biomarqueurs associés au cancer (41). Leur nombre ne cesse de croître et les cibles ayant un intérêt potentiel dans le diagnostic et/ou le traitement du cancer se multiplient, si bien qu'il est nécessaire de se poser la question des critères définissant un bon candidat pour l'imagerie phénotypique-TEP.

Le cas idéal consiste en une cible située à la surface de la cellule cancéreuse, c'est à dire facilement accessible pour le vecteur radiomarqué. L'expression de la cible doit être importante dans le tissu tumoral mais faible au niveau des organes sains. Cette différence d'expression permet en effet d'obtenir un rapport signal sur bruit important, afin de visualiser facilement les tumeurs tout en limitant l'exposition des tissus sains aux rayonnements. Les protéines de surface qui peuvent être clivées puis relarguées dans la circulation sanguine ne sont donc pas un choix judicieux. Par ailleurs, les cibles non-intériorisées après la fixation du vecteur radiomarqué sont préférables afin de s'affranchir de son métabolisme intracellulaire, pouvant conduire à la libération du radionucléide sous forme libre (22). Enfin, il est à noter que certains



biomarqueurs sont spécifiques d'un type de tumeur alors que d'autres sont exprimés dans de nombreuses situations tumorales. Ces derniers constituent des cibles plus intéressantes d'un point de vue commercial, en raison de la plus grande population de patients disponibles.

Un grand nombre de biomarqueurs, pour certains déjà très étudiés, ont servi de cibles pour la conception de radiopharmaceutiques pour l'imagerie phénotypique (voir tableau 2).

Intérêt en imagerie phénotypique-TEP		Biomarqueurs	Signification/rôle
Identifier et localiser des tumeurs		ACE TAG-72 EGP1 CD-20 CD-22 PSMA PSCA	Antigène carcinoembryonnaire Glycoprotéine-72 associée aux tumeurs Glycoprotéine épithéliale-1 Cluster de différenciation-20 Cluster de différenciation-22 Antigène membranaire spécifique de la prostate Antigène des cellules souches prostatiques
Evaluer et quantifier l'expression de récepteurs de voies de signalisation		MUC-1 HER-2 IGF1 c-KIT TGF- $\beta$	Mucine 1 associée à la surface cellulaire Récepteur-2 du facteur de croissance épidermal humain Facteur de croissance insuline-like (Proto-oncogène à protéine tyrosine kinase) Facteur de croissance transformant- $\beta$
Visualiser les modifications de molécules d'adhésion ou les altérations des voies de glycosylation		EPCAM ALCAM CA19-9	Molécule d'adhésion des cellules épithéliales Molécule d'adhésion des leucocytes activés Carbohydre antigen 19-9
Visualiser les modifications du microenvironnement tumoral	Angiogenèse	VEGF avb3, aIIb3, avb5 fibronectine	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire Intégrines
	Lymphangiogenèse	CD-105 LYVE-1	Cluster de différenciation-105 Récepteur de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques-1
	Hypoxie	CA9	Anhydrase carbonique 9

*Tableau 2. Biomarqueurs ayant été utilisés en imagerie phénotypique-TEP.*

## V Choix du vecteur

### V.1 *Structure de base d'un anticorps*

Les anticorps sont des glycoprotéines appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig). Les protéines de cette famille sont caractérisées par la présence d'au moins un domaine immunoglobuline au sein de leur structure, correspondant à un repliement intracaténaire d'environ 110 acides aminés. Les domaines Ig sont de 2 types, d'une part les domaines Ig constants (IgC) et d'autre part les domaines Ig variables (IgV). Un anticorps est formé de 4 chaînes polypeptidiques, 2 chaînes lourdes (notées H pour heavy) et 2 chaînes légères (notées L pour light), elles mêmes constituées d'un ensemble de domaines IgC et IgV. Pour un anticorps donné, les 2 chaînes lourdes et les 2 chaînes légères sont identiques entre elles. Chaque chaîne lourde comprend 3 ou 4 domaines constants ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  et  $C_{H4}$ ) et un domaine variable ( $V_H$ ) pour une masse moléculaire totale de 50 kDa. Chaque chaîne légère comprend 1 domaine constant ( $C_L$ ) et un domaine variable ( $V_L$ ), pour une masse moléculaire de 25 kDa. Les chaînes sont reliées les unes aux autres par des ponts disulfures pour former une structure en « Y » caractéristique de la structure de base d'un anticorps monomérique (voir figure 3). La masse moléculaire de ce dernier est de 150 kDa.

L'association entre un domaine variable  $V_H$ , porté par une chaîne lourde, et le domaine variable adjacent  $V_L$ , porté par une chaîne légère, constitue la partie variable de l'anticorps. Celle-ci comporte six régions hypervariables ou CDR (Complementary Determining Regions) formant des boucles entre des régions charpentes ou FR (Framework). Ces six boucles hypervariables sont propres à chaque anticorps et forment la zone de reconnaissance de l'antigène (au niveau d'un épitope), appelée paratope. Un anticorps monomérique possède deux parties variables soit au final deux paratopes, il est bivalent mais monospécifique car les deux paratopes reconnaissent le même antigène. L'avidité représente la combinaison de l'affinité de chaque liaison épitope/paratope.

En ce qui concerne la partie constante, celle-ci n'est pas ou peu impliquée dans la liaison à l'antigène mais est responsable des fonctions effectrices de l'anticorps (activation du complément ou des cellules de l'immunité innée).

Le clivage enzymatique d'un anticorps permet d'obtenir différents fragments caractéristiques. L'action de la papaine permet de dissocier les deux bras de l'anticorps pour obtenir 2 fragments Fab' (Fragment having the antigène binding site) ainsi que le fragment Fc (fragment cristallisable). L'action de la pepsine quant à elle dissocie les ponts disulfures de la région

charnière de l'anticorps, permettant d'obtenir le fragment  $F(ab')_2$  (42). D'autres fragments peuvent être obtenus par ingénierie protéique et moléculaire, en joignant différents domaines à l'aide de petites séquences d'acides aminés (linker). Le plus petit fragment permettant de retrouver le site de liaison original de l'anticorps entier est le scFv (single chain Fragment variable) (voir figure 3).

## V.2 *Particularités du ciblage en imagerie*

Les objectifs de l'imagerie phénotypique sont d'identifier, de visualiser et de localiser les tumeurs exprimant le biomarqueur ciblé. Pour visualiser des tumeurs de petite taille ainsi que pour obtenir des images facilement interprétables, il est nécessaire d'obtenir le meilleur contraste possible entre la tumeur et les organes environnants ainsi qu'avec la circulation sanguine, par l'intermédiaire de laquelle le vecteur va se distribuer.

L'obtention d'un bon contraste repose notamment sur le choix du vecteur de radioactivité, dont les propriétés idéales sont les suivantes :

- Le vecteur doit être spécifique et dirigé contre un biomarqueur qui est largement surexprimé au niveau de la tumeur par rapport à son expression au niveau des organes sains.
- L'affinité et l'avidité du vecteur envers la cible doivent être suffisamment importantes pour que celui-ci se fixe en quantité importante et de façon stable et soit retenu longtemps au niveau de la tumeur.
- La fraction de vecteur non fixée doit pouvoir être rapidement éliminée de la circulation sanguine afin de réduire au minimum le temps nécessaire à l'obtention d'un ratio tumeur sur sang important.

## V.3 *Considérations pharmacocinétiques*

En première approximation, la pharmacocinétique d'élimination du vecteur dépend essentiellement de sa taille, avec l'existence d'un effet de seuil. En effet, les molécules dont la masse moléculaire est inférieure à 65-70 kDa sont éliminées rapidement de la circulation générale par filtration glomérulaire. A l'inverse, les molécules de masse moléculaire plus importante auront une clairance rénale nettement moindre et seront éliminées par d'autres voies. Ainsi, un anticorps entier, de masse moléculaire égale à 150 kDa, peut circuler pendant 3 à 4 semaines, en étant progressivement éliminé du sang via le système réticulo-endothélial. A

l'opposé, certains fragments d'anticorps comme le scFv, de masse moléculaire égale à 25 kDa, ne sont plus détectables dans le sang 10 h après leur administration systémique d'où la possibilité de réaliser les images plus précocement.

Les vecteurs de faible masse moléculaire sont également caractérisés par une cinétique de fixation plus rapide. En revanche, la proportion de vecteur se fixant sur la cible est plus faible que dans le cas d'un anticorps entier, en raison de leur cinétique d'élimination plus rapide. La fixation des petites molécules est également plus labile, notamment en raison d'une avidité plus faible. Cette dernière est largement influencée par le nombre de valence, c'est à dire le nombre de sites de reconnaissance antigénique. Les petites molécules vectrices sont généralement monovalentes, leur avidité est donc relativement faible. A titre de comparaison, les immunoglobulines G entières qui sont bivalentes ont une avidité environ 1000 fois plus grande qu'un fragment Fab' monovalent. Le manque d'avidité d'un vecteur a pour conséquence de diminuer son temps de résidence au niveau tumoral, ce qui restreint la fenêtre d'acquisition pendant laquelle le contraste sera le plus important.

La cinétique de fixation du vecteur sur les cibles tumorales de même que sa cinétique d'élimination doivent par ailleurs être compatibles avec la période physique du radionucléide utilisé pour la détection (cf. VI. p. 37-40)

Une autre considération pharmacocinétique à prendre en compte est le cas particulier de tumeurs ayant une localisation rénale ou hépatique. Il convient en effet d'orienter le choix du vecteur en fonction de sa voie d'élimination, et donc de sa masse moléculaire, de sorte à ce que la fixation tumorale ne soit pas masquée par le métabolisme et/ou l'excrétion du vecteur.

Enfin, mis à part la taille, l'affinité et l'avidité du vecteur, la forme de celui-ci de même que son pH isoélectrique, sa charge globale, sa balance hydrophilie/lipophilie et sa concentration sanguine sont également des facteurs influençant ses paramètres pharmacocinétiques et sa capacité de pénétration dans la tumeur (22,30,43,44).

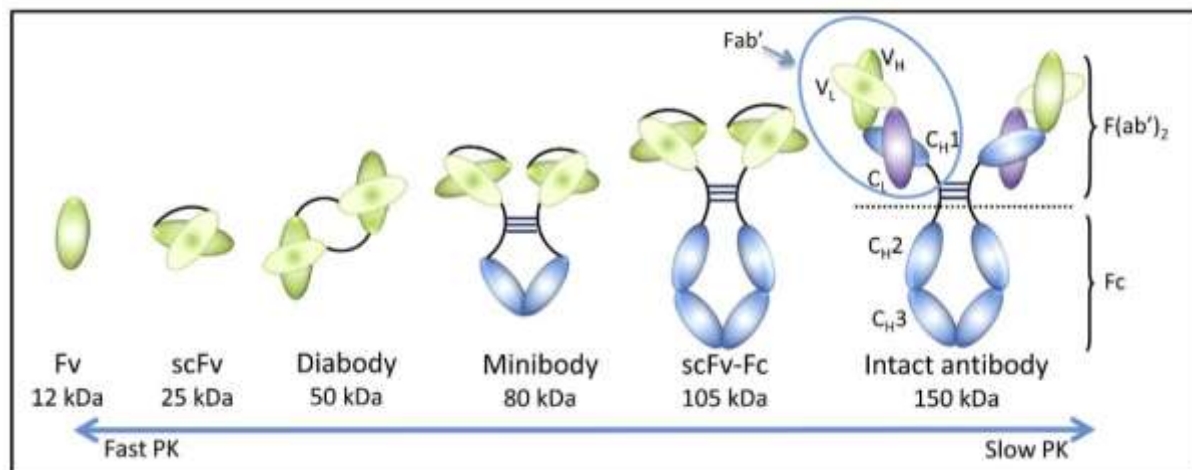
Au final, le choix du vecteur repose largement sur un compromis puisqu'aucun vecteur ne remplit toutes les caractéristiques idéales. Dans le cadre d'un objectif purement diagnostique, les vecteurs de faible masse moléculaire semblent être un choix judicieux, en particulier les fragments d'anticorps ayant été modifiés pour retrouver une bivalence.

Il ne faut cependant pas oublier les autres applications de l'imagerie phénotypique en lien avec la prise en charge thérapeutique des cancers. Les thérapies ciblées ou la RIT ont en effet des objectifs de ciblage différents de l'imagerie diagnostique. Dans leur cadre, une pharmacocinétique de distribution lente peut être un avantage afin d'espacer les

administrations et obtenir une fixation plus importante du vecteur, permettant d'accroître soit l'effet pharmacologique soit la dose délivrée.

Dans ces circonstances, les anticorps entiers demeurent des vecteurs intéressants pour l'imagerie phénotypique puisqu'ils permettent de refléter fidèlement la pharmacocinétique de leurs homologues thérapeutiques.

#### V.4 Fragments d'anticorps d'intérêt en imagerie



*Figure 3. Représentations schématiques d'un anticorps entier et des différents fragments d'anticorps obtenus par biologie moléculaire. (21)*

##### V.4.1 Fragment scFv

Le fragment scFv (single chain Fragment variable) consiste en l'assemblage d'un domaine  $V_L$  et d'un domaine  $V_H$  d'un même anticorps, à l'aide d'un peptide flexible de 12 à 25 acides aminés (linker). Le fragment ainsi obtenu est environ 6 fois plus petit (25-27 kDa) que l'anticorps entier de départ, tout en conservant sa spécificité et son affinité pour l'antigène. Les avantages de ce vecteur sont ses cinétiques de distribution et d'élimination rapides ( $T_{1/2}$  élimination = 0,5-2 h) ainsi que son ciblage efficace, permettant l'obtention d'images phénotypiques moins d'une heure après l'injection (45) (46). Les principaux inconvénients du scFv sont sa dissociation rapide de la cible antigénique (47) - en raison de son manque d'avidité (monovalence) - ainsi qu'une importante accumulation au niveau rénal pouvant être à l'origine d'une radiotoxicité (48). De ce fait, les reins constituent l'organe limitant la dose injectable. Les images obtenues par l'intermédiaire d'un fragment scFv radiomarqué sont au final de relativement mauvaise qualité. Les scFv peuvent cependant être produits facilement et à moindre coût. D'autre part, leur pharmacocinétique de distribution peut être augmentée en couplant le scFv à des polymères de

polyéthylène glycol (PEG) (49) ou à des protéines telle que l'albumine (50) ce qui permet une meilleure accumulation au niveau du site tumoral et une moindre accumulation rénale.

#### V.4.2 Diabody (dimères scFv) et multimères de scFv

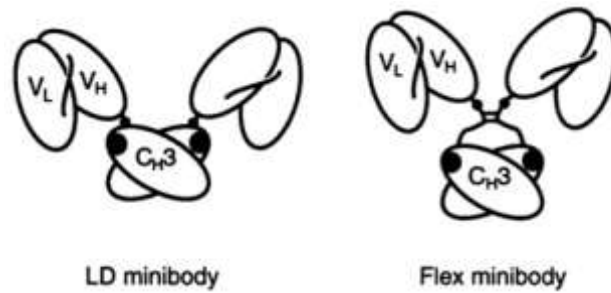
Des dimères de fragments scFv peuvent être facilement obtenus en réduisant la taille du linker joignant les domaines  $V_L$  et  $V_H$ . L'utilisation d'un linker de moins de 10 acides aminés permet en effet de modifier la configuration spatiale du scFv. Suite à cette modification, ce dernier va spontanément s'associer à un autre fragment scFv pour former un dimère où les 2 sous-unités sont liées entre elles de façon non covalente (51). Ce nouveau type de fragment, appelé diabody (50-55 kDa), permet de restaurer la bivalence caractéristique d'un anticorps d'où une amélioration de son avidité par rapport au scFv. D'un point de vue pharmacocinétique, l'augmentation de la taille et de l'avidité se traduit par une élimination plus lente ( $T_{1/2 \text{ élimination}} = 3-7 \text{ h}$ ) et une accumulation plus importante au niveau de la tumeur. Les images peuvent être obtenues avec un contraste acceptable entre 4 et 20 h après l'injection (52,53).

En réduisant davantage la taille du linker (moins de 3 acides aminés), il est possible d'obtenir des trimères et des tétramères de scFv. Ces multimères sont cependant moins stables *in vivo* que les diabody et s'accumulent de façon plus importante dans les reins, probablement suite à la dissociation en monomères scFv (54). Pour remédier à cette instabilité, les trimères peuvent également être obtenus par la liaison covalente des scFv via l'utilisation de fonctions bis-maléimides (55).

#### V.4.3 Minibody (dimères scFv-C<sub>H3</sub>)

Les minibodies (80 kDa) ont été développés dans le but d'obtenir des fragments d'anticorps ayant une masse moléculaire légèrement supérieure au seuil de filtration glomérulaire. Cette caractéristique leur permet de ne plus s'accumuler dans les reins comme les scFv ou les diabody (dans une moindre mesure) tout en conservant une cinétique de distribution et d'élimination relativement rapide ( $T_{1/2 \text{ élimination}} = 6-11 \text{ h}$ ).

La construction d'un minibody peut être réalisée en associant un scFv à un domaine constant d'un anticorps ( $C_{H3}$ ) via un linker de 2 acides aminés. Comme pour les diabodies, le fragment obtenu se dimérise spontanément et forme un minibody, soit un dimère non covalent de scFv- $C_{H3}$ . Les minibodies peuvent également être obtenus par la liaison covalente de 2 fragments scFv à 2 domaines  $C_{H3}$  par l'intermédiaire de la région charnière d'une IgG1 (56). Cette construction particulière est appelée minibody FLEX (voir figure 4).



*Figure 4. Minibody obtenu par dimérisation non covalente de scFv-C<sub>H3</sub> (à gauche) et minibody FLEX. (56)*

Les minibodies FLEX ont montré un ciblage environ 2 fois supérieur à celui obtenu avec les minibodies non covalents, 6 heures après l'injection. Les minibodies permettent d'obtenir un bon ratio tumeur sur sang, et donc un bon contraste, en moyenne 18 à 48 h après l'administration (52,57). Compte tenu de leur masse molaire, ils sont éliminés par la voie hépato-biliaire (58).

#### V.4.4 scFv-Fc

Le scFv-Fc est un fragment d'anticorps recombinant qui comprend un fragment scFv lié aux domaines C<sub>H2</sub> et C<sub>H3</sub> (région Fc) d'une IgG1 (ou IgG4) humaine via une région charnière. Le dimère (scFv-Fc)<sub>2</sub> a une masse moléculaire de 105 kDa et son comportement *in vivo* est très proche d'un anticorps entier, notamment en ce qui concerne l'efficacité du ciblage ainsi que la cinétique d'élimination (59) (60). Du fait qu'il intègre une région Fc entière, ce type de vecteur interagit *in vivo* avec le récepteur Fc néonatal (FcRn) qui permet de prolonger la demi-vie biologique des immunoglobulines (61). L'interaction spécifique entre le Fc et le FcRn a lieu au niveau des endosomes des cellules épithéliales vasculaires et permet aux immunoglobulines d'échapper à la dégradation lysosomale et d'être recyclées dans la circulation sanguine(62)(63). La cinétique d'élimination des (scFv-Fc)<sub>2</sub> peut ainsi être accélérée en modifiant l'interaction Fc/FcRn par l'introduction de mutations génétiques sélectives au niveau de régions codant pour le site d'interaction sur les domaines C<sub>H2</sub> et C<sub>H3</sub> (64). Les vecteurs obtenus par cette technique sont caractérisés par une cinétique d'élimination intermédiaire entre les minibodies et les anticorps ( $T_{1/2 \text{ élimination}} = 8 \text{ à } 80 \text{ h}$ ) (65), ce qui se traduit par un gain significatif en terme de ciblage, par rapport aux minibodies, et la possibilité de réaliser des images plus précoces qu'avec un anticorps entier.

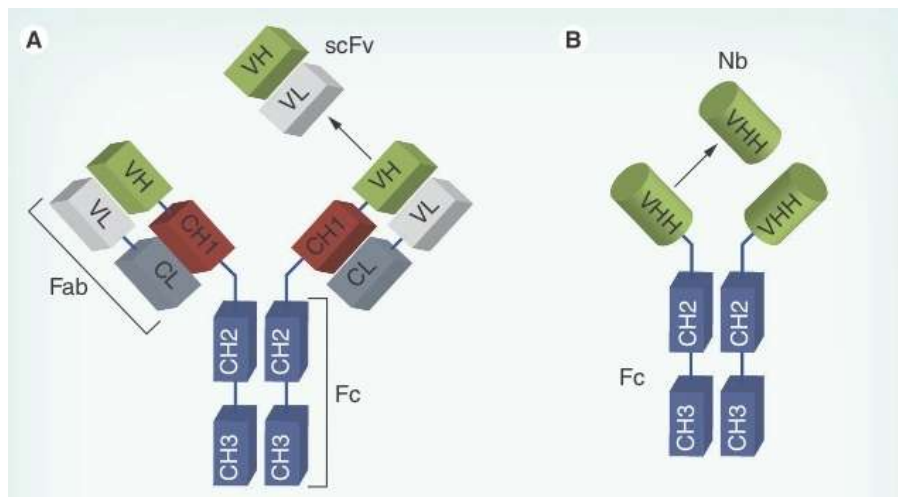
## V.5 *Vecteurs non-immunoglobulines ou apparentés*

De nouvelles structures protéiques, capables de se lier spécifiquement à un antigène, ont été récemment développées comme alternatives aux anticorps et fragments d'anticorps. Parmi ces structures, certaines sont caractérisées par une très petite taille, une grande sélectivité et spécificité, une stabilité (chimique et thermodynamique) importante, une bonne solubilité, un rendement de production important et à bas coût, ainsi qu'une architecture permettant d'être facilement modifiée. De ce fait, ces structures sont particulièrement intéressantes pour une utilisation en tant que vecteur, en imagerie phénotypique-TEP. Elles peuvent être classées en deux catégories, premièrement les structures apparentées aux Ig et deuxièmement les structures non apparentées aux Ig, dérivées de protéines humaines ou bactériennes. Une sélection non exhaustive des structures ayant actuellement un intérêt en médecine nucléaire est présentée ci-dessous.

**Les nanobodies** appartiennent à la catégorie des structures apparentées aux Ig. Il s'agit de structures dérivées des anticorps de camélidés, qui ont la particularité de ne pas présenter de chaîne légère et qui se lient à l'antigène via un unique domaine variable, nommé VHH (voir figure 5). La forme recombinante du domaine VHH est connue sous le nom de nanobody (66) en raison des dimensions nanométriques du vecteur ainsi obtenu.

A noter que d'autres espèces non mammifères présentent également des anticorps ayant des propriétés similaires, à savoir le requin et la chimère qui sont tous deux des poissons cartilagineux et dont le domaine Ig variable est nommé V-NAR. La masse moléculaire d'un nanobody est de 12 kDa et sa cinétique d'élimination est de l'ordre de 1 à 2 heures (67). Des nanobodies radiomarqués ont permis de réaliser des images avec un bon contraste dès 1 h après l'injection (67,68).





Les unités de base de reconnaissance de l'antigène sont le scFv et le VHH, respectivement pour A et B.  
(Nb = nanobody)

Figure 5. Structure d'un anticorps humain (A) et d'un anticorps de caméléidé (B). (66)

**Les affibodies** (7 kDa) appartiennent à la catégorie des structures non apparentées aux Ig. Elles sont dérivées du domaine-B de la protéine A présente à la surface de *Staphylococcus aureus*, qui est responsable de la liaison aux Ig. La surface d'interaction avec l'antigène est composée de 2 hélices alpha et peut être modifiée de façon aléatoire afin de constituer des bibliothèques phage display, à partir desquelles il est possible de sélectionner le vecteur ayant la plus grande affinité pour l'antigène d'intérêt. De part leur très petite taille, les affibodies peuvent également être produites par synthèse chimique. Ces vecteurs permettent d'obtenir des images présentant un bon contraste en moins d'une heure après l'injection (69). La première étude pilote d'imagerie phénotypique-TEP (Ga-68) mettant en jeu un vecteur non Ig a été réalisée avec un affibody dirigé contre Her-2, chez des patientes présentant un cancer du sein métastatique (70). Les images obtenues 2-3 h après injection témoignent d'une accumulation importante du vecteur dans les métastases mais également dans les reins et le foie. Il a été démontré que la modification de la charge globale de l'immunoconjugué, par l'ajout de différents motifs à base d'histidine, permet de faire varier de manière importante l'accumulation des affibodies au niveau rénal et hépatique (71)

**Les affitines** sont des structures de 66 acides aminés (7 kDa) non apparentées aux Ig. Elles sont dérivées de la protéine bactérienne Sac7d isolée chez *Sulfolobus acidocaldarius* – une archée hyperthermophile – et sont sélectionnées par la technique du ribosome display. Leur affinité (sub-nanomolaire) et leur spécificité sont comparables à celles des anticorps (72) et leur

production peut être réalisée soit par l'expression protéique dans *E.coli.*, soit par synthèse chimique. Les affinités sont stables à des températures très élevées ( $>90^{\circ}\text{C}$ ) de même que sur une très large gamme de pH (0 à 13) (73). Par conséquent, elles sont donc particulièrement adaptées pour des protocoles de marquage nécessitant des conditions réactionnelles très dures. Aucune étude de pharmacocinétique ou d'imagerie phénotypique n'a cependant été publiée à ce jour avec ce type de vecteur.

**Les DARPins** (Designed Ankyrin Repeat Proteins) sont également des vecteurs non apparentés aux Ig. Leur structure est basée sur les domaines répétés de l'ankyrine humaine, une protéine adaptatrice intracellulaire interagissant avec de nombreuses protéines membranaires et permettant notamment d'ancrer les canaux ioniques spécifiques ainsi que les échangeurs et transporteurs d'ions dans la membrane plasmique (74). Les DARPins sont composées de 2 à 4 motifs répétés et randomisés, flanqués de protections N et C-terminales également répétées. Ces dernières sont essentielles pour assurer un repliement efficace de la structure ainsi qu'une protection du cœur hydrophobe vis à vis des solvants (75,76). La structure finale possède une masse moléculaire allant de 14 à 21 kDa. Des bibliothèques de séquences randomisées ont été créées et permettent de sélectionner les vecteurs par ribosome ou phage display en fonction de leur affinité. Cette dernière peut varier d'une centaine de nanomolaires jusqu'à quelques dizaines de picomolaires. Les DARPins sont des protéines très stables : Leur point moyen de dénaturation se situe entre  $66^{\circ}\text{C}$  et  $95^{\circ}\text{C}$ , selon le nombre de répétitions. In-vivo, elles sont caractérisées par une distribution très rapide (quelques minutes) dans les tissus et ont une demi-vie d'élimination de l'ordre de 80 à 90 minutes (77). Par ailleurs, les DARPins peuvent être dimérisées et rendues bispécifiques pour reconnaître plusieurs épitopes sur une ou plusieurs cibles et ainsi accroître leur avidité (75).

Vecteur		Structure	Taille	Demi-vie d'élimination	Valence	Temps minimal entre l'administration et l'imagerie
Anticorps entier		Immunoglobuline (Ig)	150 kDa	10 j - plusieurs semaines	2	18-24h
Fragments d'anticorps	scFv	Unité de base de reconnaissance antigénique des anticorps	25-27 kDa	0,5-2 h	1	< 1 h
	Diabody	scFv dimérisé	50-55 kDa	3-7 h	2	4 h
	Minibody	scFv-CH3 dimérisé	80 kDa	6-11 h	2	18 h
	"scFv-Fc"	scFv-CH2,CH3 dimérisé	105 kDa	8-80 h	2	18 h
Structure apparentée aux Ig	Nanobodies	Domaine VHH recombinant (unité de reconnaissance antigénique de base des anticorps des camélidés)	12 kDa	1-2 heures	1	1h
Structures non apparentées aux Ig	Affibodies	Dérivé d'une protéine surfacique de <i>Staphylococcus aureus</i> (protéine A)	7kDa	< 1 h	1	< 1 h
	Affitines	Dérivé d'une protéine de <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> (Sac7D)	7kDa	< 1 h	1	NC
	DARPin	Domaines répétés de l'ankyrine humaine	14-21 kDa	1,5 h	1 ou 2 (si dimérisé)	NC

D'après (52,53,57,65,67,69,78-82). NC : non connu.

Tableau 3. Principales caractéristiques des vecteurs (anticorps, fragments d'anticorps, structures apparentées ou non apparentées aux immunoglobulines) pouvant être utilisés en imagerie phénotypique-TEP.

## V.6 *Stratégies de préciblage*

En plus des différentes solutions apportées par l'ingénierie des vecteurs, l'imagerie phénotypique-TEP peut également tirer profit des stratégies de préciblage. Celles-ci consistent à décomposer le ciblage en plusieurs étapes, en administrant séparément un anticorps spécifique de la tumeur et une molécule assurant la vectorisation du radionucléide vers cet anticorps.

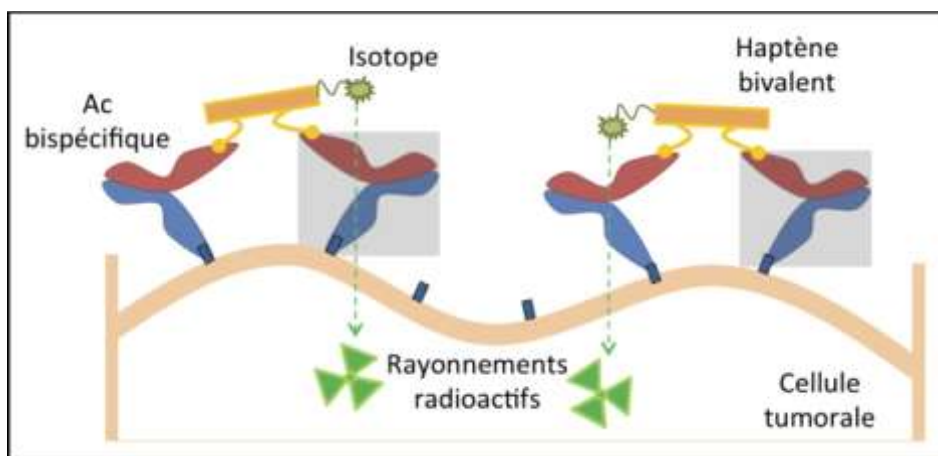
La première étape du préciblage consiste à injecter l'anticorps non radiomarqué à une dose capable de saturer les sites d'expression antigénique. L'anticorps va alors se distribuer dans l'organisme et se fixer lentement à la tumeur tout en s'éliminant des organes sains et de la circulation sanguine. La deuxième étape intervient généralement 2 à 4 jours plus tard, lorsque la distribution de l'anticorps est optimale, et correspond à l'injection d'une petite molécule radiomarquée (biotine/avidine ou haptène). Celle-ci se distribue rapidement au niveau de la tumeur et se lie spécifiquement à l'anticorps déjà fixé.

Les techniques de préciblage permettent ainsi d'obtenir un ratio tumeur sur organes sains nettement supérieur au ciblage classique impliquant un anticorps radiomarqué, par exemple. Elles peuvent être mises en œuvre dans le cadre de l'imagerie-phénotypique mais sont également particulièrement intéressantes dans le cadre de la RIT (83).

Une des méthodes classiques de pré-ciblage est basée sur l'affinité de l'avidine (ou de la streptavidine) pour la biotine (84). Une première approche consiste à injecter dans un premier temps un anticorps conjugué à la streptavidine. Quelques jours plus tard, la biotine radiomarquée est injectée et se lie rapidement à la streptavidine pré-localisée sur la tumeur (85). L'inconvénient de cette approche réside dans le fait que l'anticorps conjugué à la streptavidine possède un très long temps de résidence dans le compartiment sanguin. Pour pallier ce problème, une seconde approche en trois étapes a été développée (86,87). Elle consiste à injecter un anticorps biotinylé puis, un ou deux jours plus tard, de l'avidine est injectée à son tour. Cette dernière est rapidement éliminée par le foie après sa glycosylation et permet d'éliminer rapidement l'anticorps biotinylé, encore présent dans le sang, sur lequel va se fixer l'avidine. Trente minutes seulement après l'injection de l'avidine, la streptavidine radiomarquée peut être injectée pour aller se fixer au niveau de l'anticorps biotinylé pré-localisé au niveau de la tumeur. Contrairement à l'avidine, la streptavidine a en effet l'avantage de ne pas être glycosylée et bénéficie d'une pharmacocinétique d'élimination plus lente. Au final, cette seconde approche tend à obtenir un ratio tumeur sur organes sains similaire à la première approche – environ 10 fois plus élevé qu'avec l'anticorps directement radiomarqué – mais permet un gain de temps entre l'injection de l'immunoconjugué et l'injection de la molécule

radiomarquée. La limitation des préciblages streptavidine/biotine réside dans l'accumulation importante de la radioactivité au niveau rénal, impliquant une radiotoxicité (43).

La technique de préciblage AES (Affinity Enhancement System) a pour principe l'utilisation d'un anticorps bispécifique, dirigé d'une part contre un antigène tumoral et d'autre part contre un haptène bivalent. L'injection de l'anticorps bispécifique est réalisée dans un premier temps. Après avoir atteint la distribution optimale de ce dernier au niveau de la tumeur et son élimination de la circulation sanguine, l'haptène bivalent radiomarqué est injecté dans un deuxième temps. Etant donné la très petite taille de l'haptène, de l'ordre de 1 à 2 kDa (88), celui-ci se distribue très rapidement au niveau de la tumeur. De plus, sa bivalence lui permet de se lier à deux anticorps bispécifiques, d'où l'obtention d'un système anticorps-haptène-anticorps ayant une meilleure avidité qu'un anticorps bispécifique monovalent isolé. L'haptène est également éliminé rapidement par filtration rénale, ce qui permet de réaliser des images à courte distance de l'injection du radiopharmaceutique (89). Le préciblage par AES a été testé avec succès en RIS TEMP. Les études réalisées concluaient à une très bonne sensibilité et spécificité de l'examen comparativement à une RIS classique (90,91).



*Figure 6. Principe de la radioimmunothérapie préciblée par le système AES (Affinity Enhancement System)*

## VI Choix du radionucléide

Dans le cadre d'une application d'imagerie phénotypique-TEP, le choix du radionucléide repose sur trois critères (22,30,44) :

- Des paramètres physiques

Premièrement, la période radioactive du radionucléide doit être compatible avec la demi-vie biologique du vecteur. En effet, celle-ci conditionne le temps nécessaire à l'obtention d'un ratio tumeur sur bruit de fond optimal (cf. V.3 p. 26-28) : L'intervalle de temps entre l'injection et l'acquisition des images est au minimum de quelques heures pour les petits fragments d'anticorps ou pour certaines structures apparentées aux Ig ou non-Ig et au maximum de l'ordre de quelques jours pour les anticorps entiers.

Deuxièmement, les différents types d'émissions ainsi que leurs énergies doivent être pris en compte au niveau du schéma de désintégration : L'énergie maximale des positons doit être suffisamment faible pour obtenir des images ayant une bonne résolution spatiale et permettre une quantification précise. De plus, le rapport d'embranchement de la voie de désintégration  $\beta^+$  doit être important. Par ailleurs, l'émission de rayonnements gamma dont l'énergie est comprise dans la fenêtre de détection de la caméra TEP (350-650 keV) n'est pas souhaitable (cf. II p. 15-17).

- Des paramètres chimiques

Le choix du radionucléide va conditionner la technique de radiomarquage à mettre en oeuvre. Qu'elle soit directe ou indirecte, celle-ci ne doit pas dénaturer l'intégrité et donc l'immunoréactivité du vecteur, de même que ses caractéristiques pharmacocinétiques initiales. Le radiomarquage doit également pouvoir se faire avec un bon rendement et doit être suffisamment stable *in vivo*.

- Le mode de production

Le radionucléide doit également pouvoir être produit facilement, à faible coût et avec une activité spécifique ainsi qu'une pureté radionucléidique et radiochimique satisfaisantes. D'une manière globale, ces derniers points conditionnent la disponibilité du radionucléide.

Bien que ne remplissant pas individuellement l'ensemble de ces exigences, les différents radionucléides candidats à une utilisation en imagerie phénotypique-TEP sont : le gallium-68, le fluor-18, le cuivre-64, l'yttrium-86, le brome-76, le zirconium-89 ainsi que l'iode-124.

## VI.1 Paramètres physiques des radionucléides

Les caractéristiques physiques des différents radionucléides candidats sont résumées dans le tableau 4.

	Période radioactive (heures)	Emission b+ principale(s) (> 2 %)		g (> 10%)		Perte de résolution spatiale (mm)
		Energie max. (keV)	Intensité (%)	Energie (keV)	Intensité (%)	
Ga-68	1,13	1899	87,9	511 (annh.)	177,8	2,4
F-18	1,8	634	96,7	511 (annh.)	193,5	0,7
Cu-64	12,7	653	17,5	511 (annh.)	35	0,7
Y-86	14,7	1221	11,9	511 (annh.)	64	1,8
		1545	5,6	443	16,9	
		1998	3,6	628	32,6	
		3141	2	703	15,4	
				777	22,4	
				1077	82,5	
				1153	30,5	
Br-76	16,2	871	6,3	511 (annh.)	109	5,3
		990	5,2	559	74	
		2725	2,8	657	15,9	
		2819	2,1	1854	14,7	
		3382	25,8			
		3941	6			
Zr-89	78,4	902	22,7	511 (annh.)	45,5	1
I-124	100,2	1535	11,7	909	99	2,3
		2138	10,7	511 (annh.)	45	
				603	62,9	
				723	10,4	
				1691	11,2	

D'après (30,92)

*Tableau 4. Caractéristiques physiques des radionucléides émetteurs de positons pouvant être utilisés en imagerie phénotypique-TEP.*

### VI.1.1 Période radioactive

Considérant la période radioactive de ces radionucléides, il apparaît que le  $^{18}\text{F}$  et le  $^{68}\text{Ga}$  ne peuvent être utilisés que pour radiomarquer des petits vecteurs ou des molécules intervenant dans des stratégies de préciblage. Le  $^{68}\text{Ga}$  ( $T_{1/2} = 1,13$  h) présente néanmoins l'avantage de pouvoir être conditionné sous forme de générateur - à partir de son ascendant radioactif, le germanium-68 ( $T_{1/2} = 271$  j) - ce qui permet de résoudre les problèmes de logistique liés à son approvisionnement, à condition de réaliser les radiomarquages de manière extemporanée.

A l'opposé, l' $^{124}\text{I}$  ( $T_{1/2} = 100,2$  h) et le  $^{89}\text{Zr}$  ( $T_{1/2} = 78,4$  h) ont les demi-vies les plus longues. Celles-ci sont particulièrement avantageuses parce qu'elles excèdent le temps de distribution optimal d'un anticorps entier. L' $^{124}\text{I}$  et le  $^{89}\text{Zr}$  permettent ainsi de réaliser des images à des temps tardifs (jusqu'à 4 jours après l'administration), ce qui constitue la situation la plus favorable à l'obtention d'informations diagnostiques de qualité, avec ce type de vecteur. Leur longue période

radioactive est également un avantage logistique, notamment par rapport au temps imparti à la fabrication du radiopharmaceutique et à son acheminement vers le lieu d'administration. En revanche, elle implique une irradiation plus importante du patient (20 à 40 mSv pour une dose de 75 MBq).

Le  $^{76}\text{Br}$ , l' $^{86}\text{Y}$  et le  $^{64}\text{Cu}$  ont des périodes radioactives intermédiaires. Elles sont suboptimales si l'on considère le cas des anticorps entiers. Ces trois radionucléides sont donc plus appropriés pour le radiomarquage de vecteurs dont la taille est inférieure ou égale à un scFv-Fc. Il a cependant été démontré, pour le  $^{64}\text{Cu}$ , que des images avec un très bon contraste pouvaient être obtenues 18 h seulement après l'injection d'un anticorps entier (93).

### VI.1.2 Energie(s) et intensité(s) d'émission

Concernant l'énergie des positons, les meilleurs radionucléides sont le  $^{18}\text{F}$  et le  $^{64}\text{Cu}$  avec une énergie maximale de 634 keV et 653 keV, respectivement. Ceci se traduit par une très faible perte de résolution spatiale, de l'ordre de 0,7 mm. Le  $^{89}\text{Zr}$  est très proche de cette valeur avec 0,9 mm (902 keV). L' $^{86}\text{Y}$ , le  $^{56}\text{Br}$  et l' $^{124}\text{I}$  sont associés à une perte de résolution plus importante et ont également l'inconvénient d'émettre des rayonnements  $\gamma$  d'intensité importante entre 350 keV et 650 keV (voir tableau 4 ; valeurs en bleu). Pour rappel, ces  $\gamma$  sont à l'origine de vraies coïncidences parasites engendrant une perte de résolution intrinsèque ainsi qu'une inexactitude en quantification.

Les rapports d'embranchement de l'ensemble des radionucléides ici présentés sont suffisants pour réaliser de l'imagerie phénotypique-TEP. Le plus faible rapport d'embranchement est associé au  $^{64}\text{Cu}$ . Celui-ci émet en effet 17,5 % de positons, ce qui nécessite d'injecter une activité plus importante pour obtenir le même nombre de photons en coïncidence. Il en résulte une dosimétrie moins favorable.

## VI.2 Paramètres chimiques des radionucléides

Sur le plan de la chimie de couplage, ces différents radionucléides peuvent être répartis en 2 groupes :

- Les halogènes comme l' $^{124}\text{I}$ , le  $^{76}\text{Br}$  et le  $^{18}\text{F}$  qui peuvent être liés au vecteur par l'établissement d'une liaison covalente.
- Les métaux comme l' $^{86}\text{Y}$ , le  $^{68}\text{Ga}$ , le  $^{64}\text{Cu}$  et le  $^{89}\text{Zr}$  qui nécessitent d'être complexés et donc de mettre en œuvre un radiomarquage indirect via l'utilisation d'un ligand bifonctionnel.



Cette dichotomie halogènes vs. métaux est également un facteur important dans le comportement de ces radionucléides *in vivo*. L'internalisation des vecteurs après leur fixation sur la cible tumorale est un phénomène biologique qu'il faut particulièrement prendre en compte. En effet, l'internalisation de vecteurs radiomarqués avec l' $^{124}\text{I}$ , le  $^{76}\text{Br}$  résulte en la dissociation rapide du radionucléide. Celui-ci est alors capable de ressortir de la cellule sous forme libre. Ce phénomène va engendrer une diminution du contraste en imagerie ainsi qu'une redistribution de l'isotope dans l'organisme avec un impact dosimétrique préjudiciable sur les tissus sains (thyroïde, os, système digestif etc.).

Les radionucléides métalliques ( $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$  et  $^{89}\text{Zr}$ ) ou lanthanides ( $^{86}\text{Y}$ ) vont en revanche être retenus par la cellule après internalisation, au niveau des lysosomes. Ils sont donc plus appropriés pour le radiomarquage de vecteurs qui sont connus pour être internalisés (trastuzumab, cetuximab, bevacizumab par ex.) mais également pour les vecteurs pour lesquels on ne dispose pas de suffisamment de connaissances quant à ce phénomène.

### **VI.3 Radionucléides les mieux adaptés**

Au final, il ressort que les deux radionucléides représentant le meilleur compromis sont le  $^{64}\text{Cu}$  et le  $^{89}\text{Zr}$ . Ils associent en effet des caractéristiques physiques et chimiques favorables. Le  $^{89}\text{Zr}$  a pour avantage sa période radioactive ainsi que son meilleur rapport d'embranchement. Son principal inconvénient est qu'il est peu disponible actuellement.

Le  $^{64}\text{Cu}$  a pour avantage sa période radioactive qui est suffisamment longue pour apporter d'une part une flexibilité logistique et permettre d'autre part de radiomarquer des fragments d'anticorps de taille importante voire des anticorps entiers. Par ailleurs, le  $^{64}\text{Cu}$  est actuellement disponible – il s'agit de l'un des premiers radionucléides produits par le cyclotron ARRONAX à Saint-Herblain – et sa résolution spatiale intrinsèque est supérieure à celle du  $^{89}\text{Zr}$ . De par sa présence naturelle dans l'organisme, le comportement biologique du cuivre est bien connu et permet notamment d'envisager le marquage de vecteurs internalisés. Enfin, de par sa particularité d'émettre simultanément des positons, des particules  $\beta^-$  mais également des électrons Auger il est également envisageable d'utiliser le  $^{64}\text{Cu}$  en radioimmunothérapie (RIT ; cf. III.5 p. 22-23) (43). Une meilleure efficacité thérapeutique peut cependant être obtenue en utilisant le  $^{67}\text{Cu}$  ( $T_{1/2} = 61,8$  h) et en mettant à profit le  $^{64}\text{Cu}$  pour l'imagerie pré-thérapeutique. On parle alors d'approche « théranostique ».

# Le Cuivre-64

## I Caractéristiques physiques

Le cuivre-64 a une période physique de 12,7 h. Il se désintègre par émission bêta moins ( $\beta^-$ ) (38,48 %) vers le niveau fondamental du zinc-64. Le cuivre-64 se désintègre également par émission bêta plus ( $\beta^+$ ) (17,52 %) et par capture électronique (44 %), respectivement vers le niveau fondamental et/ou excité du nickel-64. L'annihilation du positon ( $\beta_{\max} = 653 \text{ keV}$ ) engendre l'émission de photons de 511 keV (35,04 %). La capture électronique peut se produire par deux voies distinctes : la voie directe (1675,03 keV) ou la voie indirecte (329,28 keV). Cette dernière a une probabilité de 0,47 % et conduit à l'émission d'un rayonnement gamma de 1345,75 keV à partir du niveau excité du nickel-64. (voir figure 7) (94).

Le cuivre-64 présente donc la particularité d'être à la fois émetteur de particules  $\beta^-$  et  $\beta^+$ . Il émet également des photons gamma ainsi que des électrons Auger et des photons X de fluorescence (lors du réarrangement du cortège électronique faisant suite à la capture électronique). Bien que ce spectre d'émission soit relativement complexe, il peut être exploité pour des applications diagnostiques (cf. VI.3 p.40) voire thérapeutiques.

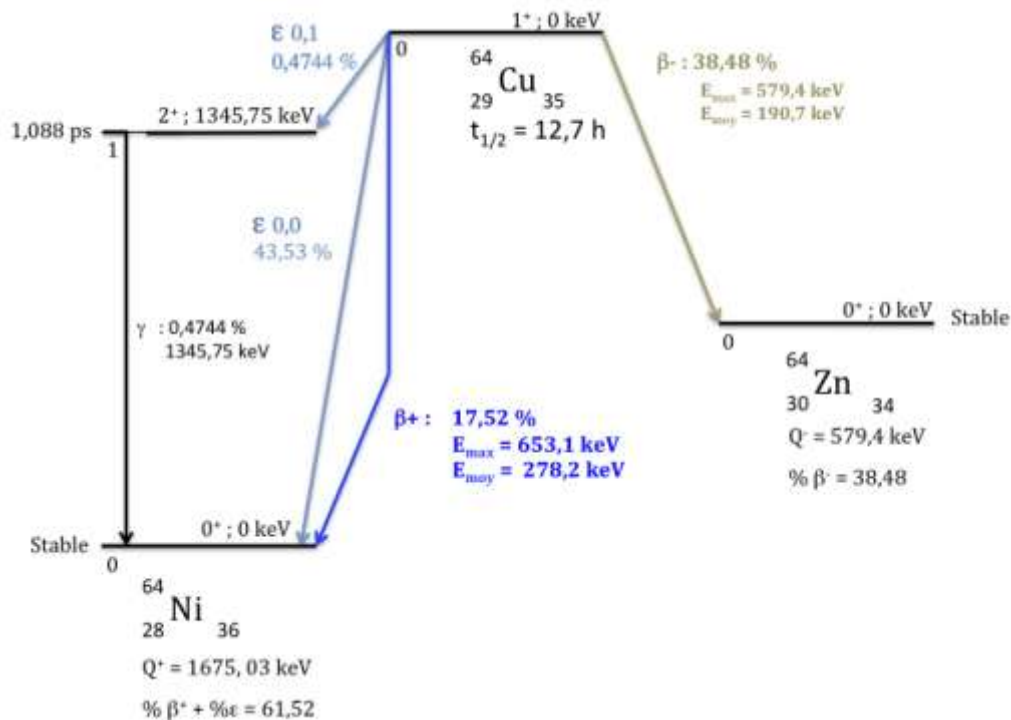


Figure 7. Schéma de désintégration du cuivre-64.

## II Production du cuivre-64

### II.1 Paramètres critiques de production (de la source de Cu-64)

#### II.1.1 Activité spécifique

La pharmacopée européenne (version 7.5) définit la radioactivité spécifique comme « la radioactivité d'un radionucléide par unité de masse de l'élément ou de la forme chimique considérée ». Il est cependant plus courant de parler d'activité spécifique, la mesure de la radioactivité correspondant en effet à une activité.

La principale problématique de la production de radionucléides à usage médical consiste à obtenir un produit ayant une activité spécifique importante, ce qui revient à avoir une grande quantité du radionucléide d'intérêt relativement aux isotopes non radioactifs présents en solution, *a fortiori* par rapport aux isotopes stables de l'élément à produire. Ce critère est en effet de première importance pour permettre de radiomarquer la plus faible quantité possible de vecteur d'intérêt, avec une activité permettant d'avoir une image de bonne qualité.

Un ordre de grandeur de l'activité spécifique requise en imagerie phénotypique peut être obtenu en prenant l'exemple du radiomarquage d'un anticorps, tel que l'exemple bien connu de la préparation du Zevalin® : Pour un marquage d'environ 2 mg d'anticorps conjugué (13,3 nmol) avec 1500 MBq d'<sup>90</sup>Y - permettant l'obtention d'un rendement de marquage de 95 % - seuls 5,6 anticorps sur 100 sont marqués avec un atome d'<sup>90</sup>Y. L'activité spécifique correspondante (env. 113 MBq/nmol) est cependant suffisante pour obtenir une action thérapeutique dans le contexte de la RIT des lymphomes folliculaires. On peut considérer qu'une activité spécifique de cet ordre de grandeur est également satisfaisante en imagerie du fait que l'expression du biomarqueur au niveau de la cellule tumorale est de l'ordre de 10<sup>5</sup> unités par cellule (95), d'où l'obtention d'un contraste suffisant.

La quantité de vecteur injectée au patient doit également être la plus faible possible pour ne pas saturer les sites d'expression antigénique, ne pas induire d'action pharmacologique, ainsi que pour limiter le risque d'une immunisation vis à vis du vecteur.

L'obtention de cuivre-64 ayant une grande activité spécifique, souvent désigné par la mention « sans entraîneur », est d'autant plus difficile que le cuivre est un métal omniprésent dans

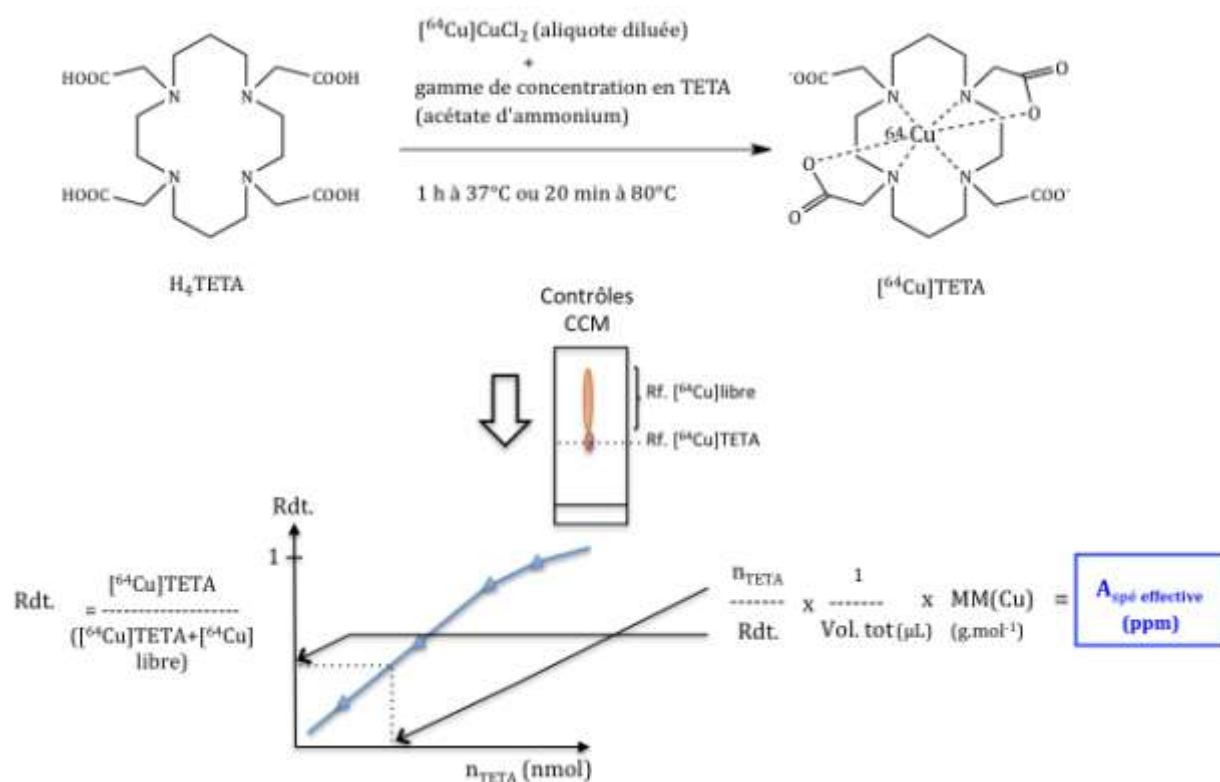
l'environnement. L'utilisation d'une cible dans un matériau autre que le cuivre permet de réaliser une étape de purification terminale afin de séparer le cuivre-64 de l'élément constituant la cible ainsi que des produits des réactions nucléaires concomitantes. Il est toutefois nécessaire de veiller scrupuleusement à ne pas apporter de contaminants métalliques extérieurs tout au long du processus de production, de la préparation de la cible au conditionnement final en passant par l'irradiation de la cible et l'étape de purification. Les produits chimiques intervenant dans les étapes de purification doivent pour cela être choisis avec une pureté métallique de l'ordre du ppb. De même, il convient de s'assurer que le métal constituant la cible (Ni-64, Zn-68 par ex.) contienne peu de métaux contaminants. L'eau utilisée doit être de qualité ultra pure. Les bouchons et récipients en plastique doivent être à usage unique, les béchers et flacons doivent être en verre ayant une résistance hydrolytique accrue (verre borosilicaté de classe I) et l'ensemble de ces éléments doivent être lavés avec de l'acide chlorhydrique ou nitrique avant utilisation, puis rincés à l'eau. Les résines échangeuses d'ions, utilisées pour l'étape de purification, doivent également être lavées et conditionnées avec un acide concentré. De plus, il est préférable, après irradiation de la cible, de procéder à un décapage de la seule face présentant le matériau enrichi (le cas échéant) puisque la face opposée est souvent en contact avec l'eau de refroidissement du cyclotron, source non négligeable de métaux contaminants.

L'activité spécifique maximum théorique de 9,4 TBq/ $\mu$ mol de cuivre n'est cependant jamais atteinte en pratique, quelle que soit la voie de production engagée, le matériel ou les procédés mis en œuvre pour s'affranchir des sources de contamination. Actuellement, les activités spécifiques rapportées sont comprises entre 200 et 7000 GBq/ $\mu$ mol pour les meilleurs sites de production. La variabilité inter-production est cependant importante, il y a donc encore des points à améliorer, notamment en ce qui concerne la préparation de cibles dépourvues de cuivre et les techniques de purifications. Des procédés automatisés de purification du cuivre-64 ont été développés dans le but d'améliorer la reproductibilité de cette dernière étape, ainsi que pour limiter la dose délivrée aux opérateurs dans le cadre de la production d'activités importantes (96-98).

La mesure des impuretés métalliques présentes dans la solution de  $^{64}\text{Cu}$  finale, permettant le calcul de l'activité spécifique, peut être réalisée de différentes manières au cours du contrôle qualité. La méthode la plus précise consiste à doser les métaux par ICP-MS (spectrométrie de masse par torche à plasma) ou par ICP-OES (spectrométrie d'émission atomique par torche à plasma). Cet appareillage est cependant très coûteux et n'est souvent pas disponible sur les sites de production.

Une alternative consiste à réaliser un dosage à l'aide d'une gamme de concentration d'un ligand macrocyclique tétraazoté spécifique du cuivre, le TETA par exemple (voir figure 22). Le

rendement de marquage (pourcentage de complexation du  $^{64}\text{Cu}$ ), exprimé en fonction de la quantité de ligand utilisée, permet de déterminer l'activité spécifique effective sur une portion linéaire de la courbe de dosage (voir figure 8). Cette méthode présente l'avantage d'être le reflet des conditions de marquages qui seront rencontrées lors de l'utilisation du radionucléide. En revanche, l'information obtenue est d'un intérêt limité pour le suivi de la production puisqu'elle ne permet pas de quantifier la totalité des métaux présents en solution, indépendamment les uns des autres.



Rdt. : Rendement de radiomarquage

Figure 8. Réaction de complexation mise en jeu pour la détermination de l'activité spécifique effective lors du dosage avec le ligand macrocyclique tetraazoté TETA.

### II.1.2 Pureté radionucléidique

Quelle que soit la réaction de transmutation nucléaire mise en jeu pour produire le  $^{64}\text{Cu}$ , d'autres réactions conduisant à la production d'impuretés radionucléidiques peuvent avoir lieu de façon concomitante. Comme pour toute production de radionucléide à usage médical, ces impuretés doivent être réduites le plus possible, notamment par des étapes de purification, afin d'obtenir un produit remplissant les exigences de qualité et de sécurité adéquates.

## II.2 Les différentes voies possibles

Le cuivre-64 peut être produit de manière efficace soit en accélérateur (cyclotron), soit en réacteur neutronique. La production en réacteur est cependant marginale de nos jours, notamment en raison de la multiplication des cyclotrons ayant des caractéristiques techniques adéquates pour produire ce radionucléide.

### II.2.1 Production en cyclotron

#### II.2.1.1 Production à partir du $^{64}\text{Ni}$ : $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ et $^{64}\text{Ni}(d,2n)^{64}\text{Cu}$

La production de  $^{64}\text{Cu}$  par la réaction  $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$  est la voie la plus utilisée actuellement. Sa mise en œuvre sur un cyclotron à usage médical a été décrite par Szelecsenyi et al. (99) en 1993 et a depuis fait l'objet de nombreuses améliorations et changements d'échelle (98,100,101). Il a notamment été démontré que le  $^{64}\text{Cu}$  pouvait être produit en grande quantité, de l'ordre de 37 GBq (1 Ci), sur un cyclotron médical aux caractéristiques standard, classiquement utilisé pour la production de  $^{18}\text{F}$  ou de  $^{11}\text{C}$  (97).

D'une manière générale, des protons sont accélérés à une énergie incidente de 11 à 14 MeV pour irradier une cible constituée d'un électro-dépôt de  $^{64}\text{Ni}$  enrichi. Différents matériaux peuvent être utilisés comme support de cible : l'or, l'argent, le cuivre recouvert d'un dépôt d'argent etc., chacun ayant ses avantages et inconvénients résumés dans le tableau 5. Comme pour la plupart des réactions (p,n), la section efficace de la réaction  $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$  suit une fonction passant par un maximum. Celui-ci est de 600 mb à 11 MeV (voir figure 9).

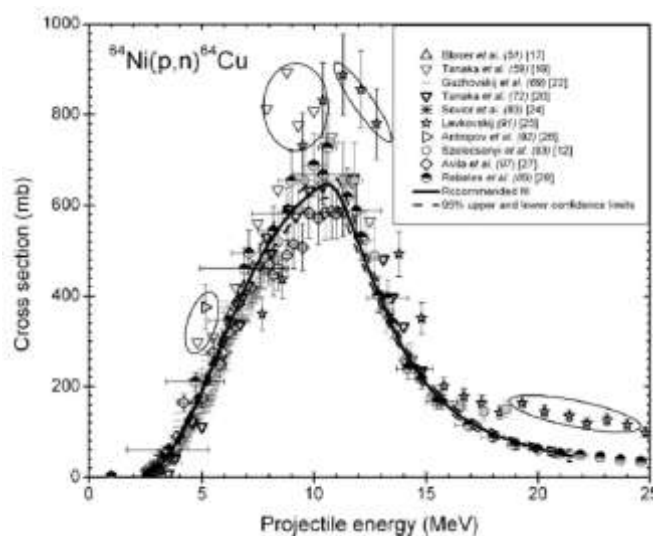


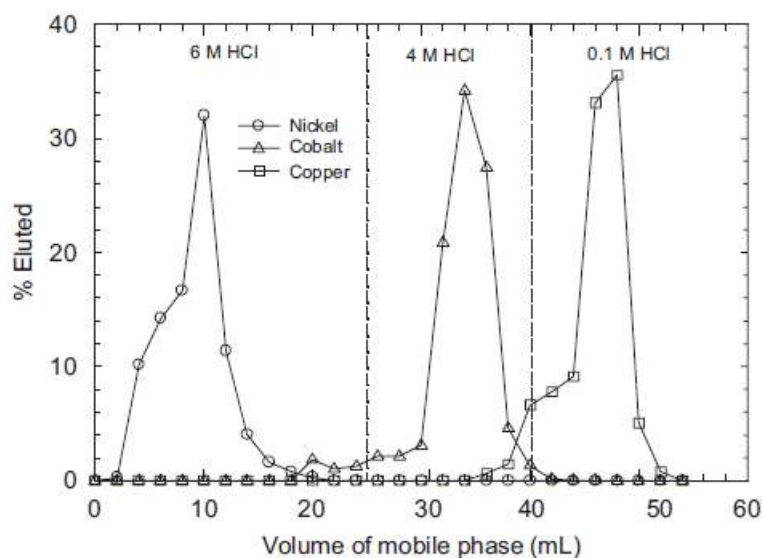
Figure 9. : Section efficace de production en fonction de l'énergie incidente des particules pour la réaction  $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ . (102)

Matériau du support de cible	Avantage(s)	Inconvénient(s)
Or	Réutilisable sur plusieurs années Faible activation	Coût important à l'achat
Argent	Grande conductivité thermique Coût faible (par rapport à l'or)	Présence de contaminants métalliques Activation importante
Argent sur cuivre	Coût faible Grande conductivité thermique	Présence de contaminants métalliques Risque de contamination par le cuivre
Or sur cuivre	Coût faible Bonne adhérence	Risque de contamination par le cuivre
Graphite	Haute pureté métallique Pas d'activation Coût faible Haute température de fusion	Limite l'épaisseur du dépôt de Ni-64

*Tableau 5. Récapitulatif des avantages et inconvénients des matériaux pouvant être utilisés comme support de cible pour la production de  $^{64}\text{Cu}$  à partir du  $^{64}\text{Ni}$ .*

L'inconvénient de la voie (p,n) est le coût de la matière première enrichie, le  $^{64}\text{Ni}$ , dont l'abondance naturelle est de 0,91 % (103). Celui-ci n'est en effet produit que par un seul fournisseur (JV ISOFLEX, Russie) et commercialisé à hauteur de 20 à 30 euros/mg. Le recyclage du  $^{64}\text{Ni}$  en fin de production est donc indispensable d'un point de vue économique, d'autant que la production de  $^{64}\text{Cu}$  pour une utilisation médicale multi-patients nécessite l'utilisation de plusieurs centaines de milligrammes de  $^{64}\text{Ni}$  par cible. Le rendement de cette étape de recyclage est de 85-95 % (100).

Le principal radionucléide contaminant coproduit lors de l'irradiation est le  $^{61}\text{Co}$  ( $T_{1/2}=1,65$  h), via à la réaction  $^{64}\text{Ni} (p,\alpha)^{61}\text{Co}$ . En plus d'avoir une période physique courte, il est facile de le séparer du cuivre par chromatographie échangeuse d'ions, lors de l'étape de purification terminale (voir figure 10).



*Figure 10.* Profil de séparation du Ni, Co et Cu, élués par des concentrations décroissantes d'acide chlorhydrique sur résine échangeuse d'anions. (101)

Tous les cyclotrons ne sont pas en mesure de fournir un faisceau de protons de faible énergie (11 MeV), de façon répétable, pour réaliser la réaction  $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ . C'est notamment le cas de cyclotrons médicaux de plus haute énergie (16,5-19 MeV) ou de cyclotrons de recherche comme ARRONAX (70 MeV). Un dégradeur est classiquement utilisé pour réduire l'énergie du faisceau incident mais pour des réductions d'énergie importantes cela s'accompagne d'un étalement de la section du faisceau ainsi que d'une dispersion de l'énergie des particules accélérées. Pour pallier ces inconvénients, une voie de production utilisant des deutons (noyaux de deutérium) a été développée pour produire le  $^{64}\text{Cu}$ , toujours à partir du  $^{64}\text{Ni}$ , selon la réaction  $^{64}\text{Ni}(d,2n)^{64}\text{Cu}$  (104). La section efficace maximale de la réaction (d,2n), 800 mb à 14 MeV, est plus importante que pour la réaction (p,n). De plus, la courbe de la section efficace en fonction de l'énergie (voir figure 11) décroît avec une pente moindre de part et d'autre du maximum, pour la réaction (d,2n) par rapport à la réaction (p,n). Du fait de ces paramètres plus favorables, il est possible d'obtenir un rendement de production équivalent à celui de la réaction (p,n) en utilisant une épaisseur de  $^{64}\text{Ni}$  25 % moindre (voir tableau 6). Ce dernier point constitue un avantage certain de la voie (d,2n) du fait des économies pouvant être réalisées sur le coût du  $^{64}\text{Ni}$  enrichi.



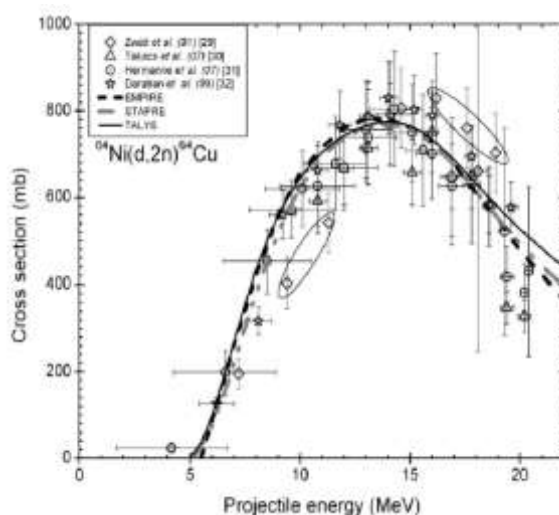


Figure 11. Section efficace de production en fonction de l'énergie incidente des particules pour la réaction  $^{64}\text{Ni}(d,2n)^{64}\text{Cu}$ . (102)

En ce qui concerne la production de radionucléides contaminants, le  $^{61}\text{Co}$  est produit en moins grande quantité que pour la réaction (p,n), en revanche, la réaction (d,2n) produit du  $^{65}\text{Cu}$  stable ainsi que du  $^{65}\text{Ni}$  ( $T_{1/2} = 2,52$  h) qui décroît en  $^{65}\text{Cu}$ , d'où un impact défavorable sur l'activité spécifique finale. Cette contribution est cependant très faible comparativement aux sources extérieures de cuivre non radioactif pouvant contaminer le produit final lors de la production. Dans le cas le plus défavorable, où la purification est effectuée suffisamment tard pour que tout le  $^{65}\text{Ni}$  ait décré en  $^{65}\text{Cu}$ , le ratio est de 1 atome de cuivre stable pour 3,8 atomes de  $^{64}\text{Cu}$ , pour une heure d'irradiation.

Réaction nucléaire	Gamme d'énergie (MeV)	Epaisseur de cible ( $\mu\text{m}$ )	Rendement théorique (MBq/ $\mu\text{Ah}$ )
$^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$	12-9	120 $\mu\text{m}$	228
$^{64}\text{Ni}(d,2n)^{64}\text{Cu}$	16-13	90 $\mu\text{m}$	206

Tableau 6. Rendements théoriques de production du  $^{64}\text{Cu}$  pour les réactions  $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$  et  $^{64}\text{Ni}(d,2n)^{64}\text{Cu}$ .

### II.2.1.2 Production à partir du $^{68}\text{Zn}$

Le  $^{64}\text{Cu}$  peut également être obtenu par la réaction  $^{68}\text{Zn}(p,\alpha n)$ , en tant que sous-produit lors de la production de  $^{67}\text{Ga}$  via la réaction  $^{68}\text{Zn}(p,pn)^{67}\text{Ga}$ , à une énergie incidente de 23,5 MeV (105). Le  $^{64}\text{Cu}$  est séparé du  $^{67}\text{Ga}$  et du  $^{64}\text{Zn}$  par 3 chromatographies échangeuses d'ions successives. Cette voie de production permet d'obtenir des activités importantes, supérieures à 100 GBq, avec une

activité spécifique supérieure à 30 GBq/μmol, à condition d'adapter la ciblerie classiquement utilisée pour la production du  $^{67}\text{Ga}$ . La cible en cuivre doit en effet être recouverte d'or, par électrodéposition, avant de déposer le  $^{68}\text{Zn}$ , ceci afin d'éviter des contaminations par du cuivre stable lors du traitement chimique de la cible. Le principal avantage de cette voie de production est d'ordre économique, puisque le  $^{68}\text{Zn}$  peut être obtenu avec un enrichissement supérieur à 97 % à un coût dix fois moindre que le  $^{64}\text{Ni}$ . Le recyclage de la matière première enrichie demeure toutefois nécessaire. L'inconvénient de cette voie est qu'une production à la demande de  $^{64}\text{Cu}$  est difficilement envisageable puisque le principal radionucléide produit, le  $^{67}\text{Ga}$  ( $T_{1/2}=72$  h), a une période radioactive 5,6 fois plus longue que le  $^{64}\text{Cu}$ . La section efficace de production à 23,5 MeV du  $^{67}\text{Ga}$  est en effet de 664 mb contre 50 mb pour le  $^{64}\text{Cu}$ .

## II.2.2 Production en réacteur nucléaire

### II.2.2.1 *Par capture de neutrons thermiques*

La production du  $^{64}\text{Cu}$  peut être réalisée en réacteur, par capture neutronique, en irradiant le  $^{63}\text{Cu}$  stable avec des neutrons thermiques via la réaction  $^{63}\text{Cu}(n,\gamma)^{64}\text{Cu}$  (106). Le  $^{64}\text{Cu}$  produit avec cette méthode possède une activité spécifique très faible qui n'est pas compatible avec un usage médical, toutefois il peut être utilisé pour la calibration d'appareils de mesure ou de caméra TEP par exemple.

### II.2.2.2 *Par capture de neutrons rapides*

L'obtention de  $^{64}\text{Cu}$  ayant une activité spécifique élevée n'est possible qu'à condition d'utiliser une cible dont le matériau est autre que le cuivre. Dans le cadre d'une production en réacteur, cela nécessite d'utiliser un mode de capture différent en mettant en jeu des neutrons d'énergie plus élevée, appelés neutrons rapides. Le bombardement d'une cible de  $^{64}\text{Zn}$  par des neutrons rapides est ainsi à l'origine d'une réaction  $^{64}\text{Zn}(n,p)^{64}\text{Cu}$ . Cette méthode a été développée au réacteur de recherche de l'université du Missouri (MURR, USA) en 1994 et permet l'obtention d'une dizaine de GBq avec une activité spécifique de 1200 GBq/μmol (107). Bien qu'étant le premier mode de production à fournir du  $^{64}\text{Cu}$  avec des caractéristiques compatibles avec une utilisation médicale, de nouvelles voies de productions en accélérateurs ont dû être développées en raison des faibles cadences de production sur ce réacteur de recherche et plus globalement du fait de la rareté et de la vétusté de ce type d'équipement à l'échelle internationale.

## II.3 Production du Cu-64 au cyclotron ARRONAX

### II.3.1 Caractéristiques du cyclotron ARRONAX

ARRONAX est l'acronyme d'Accélérateur pour la Recherche en Radiochimie et en Oncologie à Nantes Atlantique. Le cyclotron ARRONAX, opérationnel depuis février 2011, est situé sur le site de l'hôpital Nord Laennec du CHU de Nantes, sur la commune de Saint-Herblain. Il s'agit d'un cyclotron de haute énergie et de haute intensité capable d'accélérer des particules positives ( $\text{HH}^+$ ,  $\text{He}^{++}$ ) et négatives ( $\text{H}^-$ ,  $\text{D}^-$ ) jusqu'à 70 MeV. Par ailleurs, il permet de délivrer jusqu'à 750  $\mu\text{A}$  de protons (375  $\mu\text{A}$  sur 2 faisceaux simultanés) et 35  $\mu\text{A}$  de particules alpha (108).

Faisceau	Particule accélérée	Gamme d'énergie (MeV)	Intensité ( $\mu\text{A}$ )	Nombre de faisceaux simultanés
Protons	$\text{H}^-$	30-70	< 375 (x 2)	2
	$\text{HH}^+$	17,5	< 50	1
Deutons	$\text{D}^-$	15-35	50	2
$\alpha$	$\text{He}^{++}$	70	< 35	1

*Tableau 7. Caractéristiques des différents faisceaux de particules accélérées disponibles au cyclotron ARRONAX.*

### II.3.2 Voie de production retenue

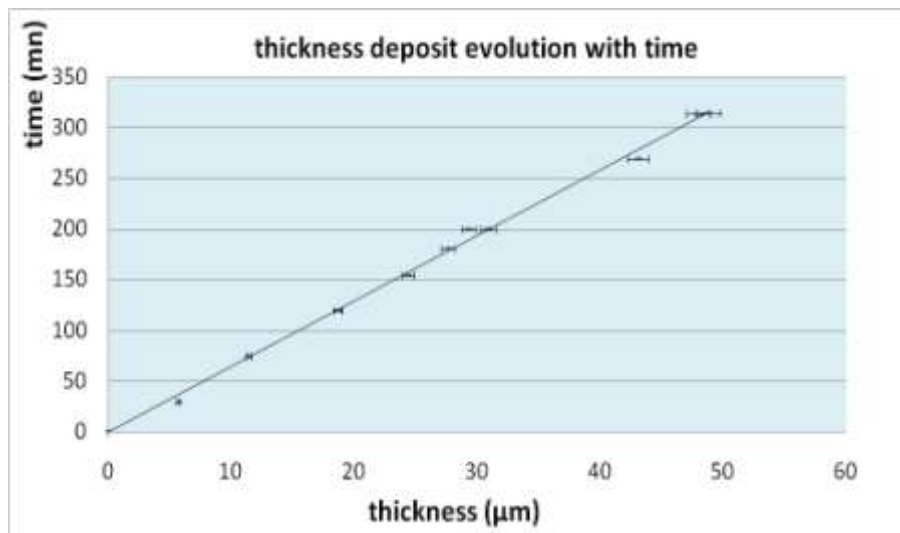
Etant donné que ARRONAX est un cyclotron de haute énergie, l'obtention de protons de basse énergie ne peut être obtenue sans dégrader considérablement l'énergie du faisceau (cf. II.2.1.1 p.47). C'est donc la voie  ${}^{64}\text{Ni}(\text{d},2\text{n})$  qui a été retenue pour produire le  ${}^{64}\text{Cu}$ , étant donné que le cyclotron est capable d'accélérer des deutons de 15 à 35 MeV (voir tableau 7). Actuellement, la production est réalisée par l'irradiation d'une cible de  ${}^{64}\text{Ni}$  (30  $\mu\text{m}$  d'épaisseur électrodéposé sur un support de cible en or) avec un faisceau de deutons d'énergie incidente de 16 MeV et de 35  $\mu\text{A}$  d'intensité.

Avant d'interagir avec la cible de nickel-64, les deutons doivent traverser une feuille de Kapton® (polymère de type polyimide) dont le rôle est d'assurer le maintien du vide dans la ligne faisceau. La traversée de ce matériau dégrade l'énergie des deutons qui en ressortent avec une énergie de 13,5 MeV, soit l'énergie permettant d'obtenir la meilleure section efficace (voir figure 11).

### II.3.3 Electrodeposition de la cible de $^{64}\text{Ni}$

Le dépôt de  $^{64}\text{Ni}$  sur le support de cible en or s'effectue par électrodéposition. Cette technique repose sur la réduction électrolytique d'ion nickel en solution en nickel métal sur le support de cible. Ce dernier joue le rôle de cathode, l'anode étant constituée d'une tige de platine. Le  $^{64}\text{Ni}$  est tout d'abord dissout dans de l'acide nitrique à 6 M et évaporé à sec. Le résidu obtenu est traité par un excès d'acide sulfurique à 1 M puis lavé à l'eau et évaporé à sec. Ce second résidu est dilué avec de l'eau désionisée, le pH est ensuite ajusté à 9,8 avec une solution d'hydroxyde d'ammonium concentrée et de sulfate d'ammonium. Le volume de la solution d'électrodéposition est finalement ajusté à 8 g/L de nickel.

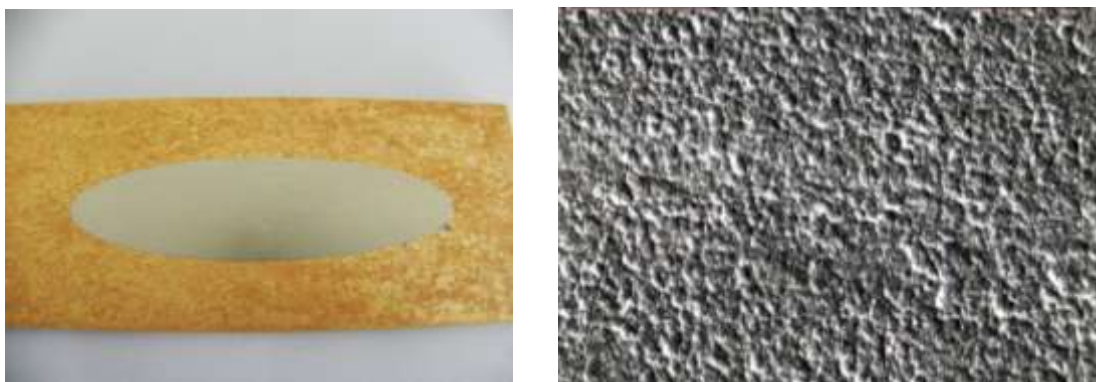
Durant l'électrodéposition la solution est maintenue à 30°C sous agitation mécanique. Le potentiostat délivre un courant de 8 mA/cm<sup>2</sup> avec une différence de potentiel de -1,1 V. L'épaisseur du dépôt (50 μm au maximum) est obtenue en ajustant la durée et l'intensité électrique d'électrodéposition (voir figure 12).



*Figure 12. Temps d'électrodéposition en fonction de l'épaisseur du dépôt de nickel.*

La forme du dépôt est prédéfinie par un masque déposé sur le support de cible. Le choix d'un dépôt ellipsoïdal (voir figure 13) est justifié par le fait que la cible n'est pas disposée perpendiculairement au faisceau mais est inclinée à 15° par rapport à celui-ci (voir figure 14). Ceci permet d'augmenter l'épaisseur de dépôt traversée par le faisceau d'un facteur «  $1/\sin 15^\circ$  », soit environ 4, et d'augmenter d'autant le rendement de production. De plus, l'augmentation de la surface permet de refroidir plus facilement la cible.

L'épaisseur, la qualité du dépôt et la pureté en  $^{64}\text{Ni}$  sont contrôlés par microscopie optique (voir figure 13) et par spectroscopie dispersive en énergie des rayons X (analyseur EDX).



*Figure 13. Dépôt de  $^{64}\text{Ni}$  de  $14\text{ cm}^2$  sur un support de cible en or ( $11,9\text{ cm} \times 5\text{ cm} \times 3\text{ cm}$ ), à gauche, et grossi à  $\times 120$  au microscope optique, à droite.*



*Figure 14. Cible permettant la production de  $^{64}\text{Cu}$  à ARRONAX (au centre), accompagnée de son dispositif de refroidissement et de transport pneumatique (navette).*

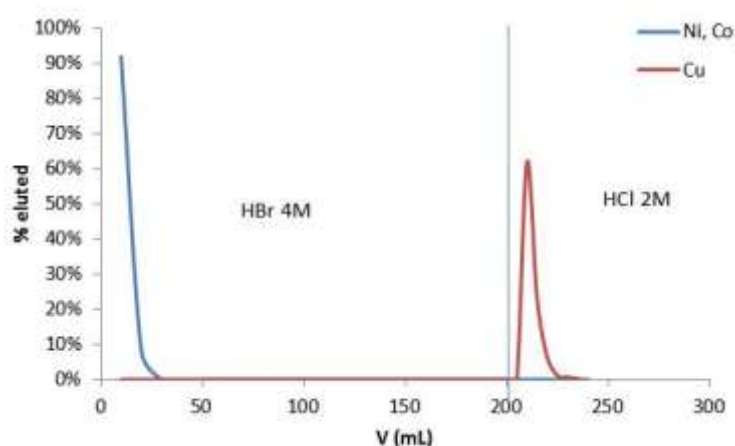
### II.3.4 Extraction et purification du $^{64}\text{Cu}$

Après irradiation, la cible est acheminée dans l'enceinte blindée de réception via son système de transport pneumatique. La cible est retirée de ce dernier puis rincée avec de l'acide chlorhydrique (HCl) à 0,1 M. Le dépôt de nickel est dissout dans 30 mL d'HCl à 6 M qui sont ensuite évaporés à sec. Le résidu est repris par 30 mL d'acide bromhydrique (HBr) à 4 M.

La séparation chimique du cuivre, du nickel et du cobalt est réalisée par chromatographie sur une résine échangeuse d'ions. Bien que le cuivre soit sous forme cationique en solution ( $\text{Cu}^{2+}$ ), une résine échangeuse d'anions (Bio-Rad AG1x8, fortement basique, forme Cl<sup>-</sup>) a été retenue pour séparer les complexes métalliques anioniques, formés suite au traitement par l'acide bromhydrique concentré. Dans le cadre de la séparation de métaux de transition, la

chromatographie échangeuse d'anions est en effet une technique plus reproductible que la chromatographie échangeuse de cations. Elle a de ce fait été largement utilisée pour la purification du  $^{64}\text{Cu}$  (96,98,100,101), en employant la même résine que celle citée plus haut.

Les 30 mL de solution contenant les radionucléides à séparer sont déposés en tête de colonne sur 5 g de résine et élués au débit de 2 mL/min. Le nickel et le cobalt sont élués en premier avec 170 mL d'HBr à 4 M, ils ne forment en effet pas de complexes anioniques avec les bromures à cette concentration en HBr (voir figure 15). Dans ces mêmes conditions, le cuivre forme des complexes tetrabromocuprates  $[\text{CuBr}_4]^{2-}$  ce qui explique qu'il soit fortement retenu sur la colonne. La diminution de la concentration en HBr permet de provoquer la dissociation de ces complexes, le cuivre est ainsi élué sélectivement avec 25 mL d'HCl à 2 M en fin de colonne. L'éluât contenant le  $^{64}\text{Cu}$  est évaporé à sec puis repris dans un volume d'HCl à 0,1 M permettant d'obtenir l'activité volumique souhaitée à calibration. Le cuivre-64 est donc sous forme  $^{64}\text{CuCl}_2$  dans la solution finale et peut-être utilisé en l'état pour les radiomarquages.



*Figure 15.* Profil d'éluion obtenu avec la résine AG1x8 lors de la purification du  $^{64}\text{Cu}$  avec la méthode développée à ARRONAX.

#### II.3.4.1 **Précautions particulières**

Afin d'optimiser l'activité spécifique, de nombreuses précautions sont prises tout au long de l'étape de purification pour s'affranchir le plus possible d'éventuelles contaminations métalliques : Les différents produits chimiques utilisés sont de grade ultrapure, la verrerie est lavée avec une solution d'acide nitrique 1% contenant de l'eau oxygénée puis rincée avec de l'eau milli-Q (Millipore®), l'enceinte blindée est scrupuleusement nettoyée avant chaque production, la résine est lavée plusieurs fois avec de l'HBr puis rincée à l'eau milli-Q avant d'être utilisée.

### II.3.5 Recyclage du $^{64}\text{Ni}$

Le  $^{64}\text{Ni}$  peut-être recyclé à partir des premières fractions obtenues lors de la purification du  $^{64}\text{Cu}$  et contenant un mélange de nickel et de cobalt en  $\text{HBr}$  4 M (voir figure 15). Ces fractions sont tout d'abord évaporées à sec puis le résidu est repris avec 20 mL d' $\text{HCl}$  à 9 M. La solution ainsi obtenue est déposée sur une colonne contenant 20 g de résine AG1x8 préalablement conditionnée en  $\text{HCl}$  9 M. Le  $^{64}\text{Ni}$  est récupéré dans les premières fractions en éluant la colonne avec l' $\text{HCl}$  9 M (voir profil type, figure 10). Le cobalt et le cuivre (provenant en partie de la décroissance du  $^{65}\text{Ni}$ ) restent eux retenus sur la résine. Les fractions contenant le  $^{64}\text{Ni}$  sont finalement évaporées à sec puis le résidu repris avec du tampon sulfate d'ammonium. Cette solution peut être utilisée en l'état pour la prochaine électrodéposition. Le rendement de cette étape de recyclage est de  $95 \pm 4 \%$ .

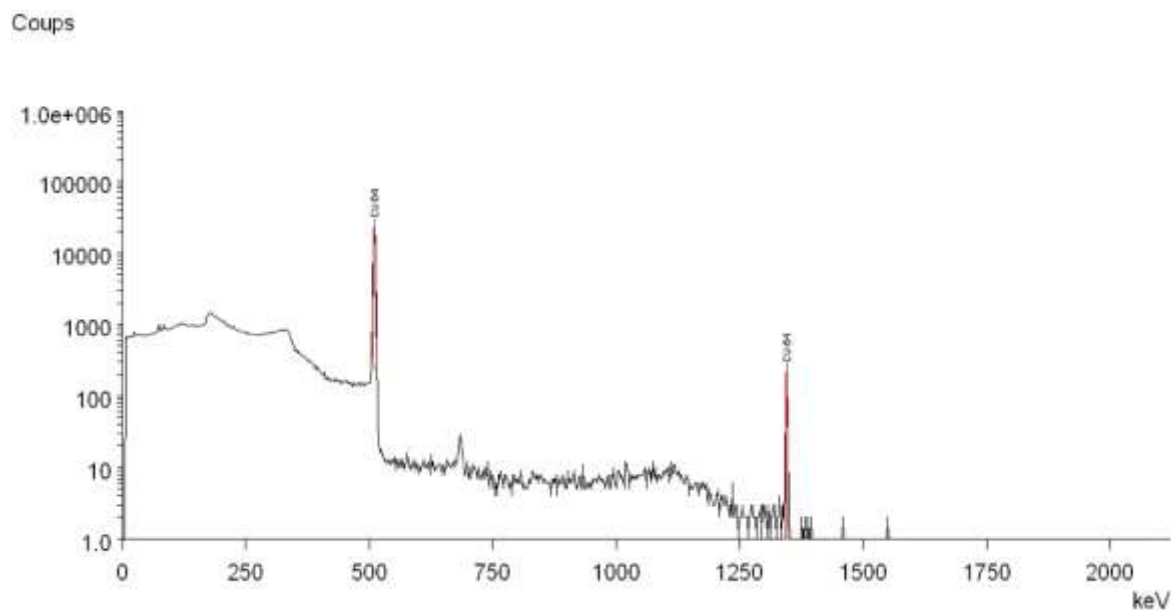
### II.3.6 Contrôle qualité de la solution de $^{64}\text{CuCl}_2$

Les contrôles qualité réalisés sur la solution de  $^{64}\text{CuCl}_2$  finale ont pour but de vérifier que celle-ci répond aux exigences fixées permettant le radiomarquage d'anticorps ou de toute autre biomolécule d'intérêt.

La source de  $^{64}\text{Cu}$  doit pour cela être caractérisée par une pureté radionucléidique supérieure à 99 %, une activité volumique supérieure à 890 MBq/mL et une activité spécifique supérieure à 10 GBq/ $\mu\text{mol}$ . Cette dernière est calculée par rapport aux métaux (non radioactifs) les plus compétiteurs pour les marquages au  $^{64}\text{Cu}$ , à savoir le cuivre, le nickel, le fer, le cobalt et le zinc.

#### II.3.6.1 *Identification du $^{64}\text{Cu}$ et pureté radionucléidique*

L'identification du  $^{64}\text{Cu}$  est réalisée par spectrométrie gamma à l'aide d'un détecteur à semi-conducteur HPGe (high-purity germanium). Ce détecteur est isolé par un blindage assurant un très faible bruit de fond et est régulièrement étalonné dans la géométrie de comptage retenue avec des sources standard multi-gamma obtenues auprès du CERCA-LEA (Laboratoire Etalons d'Activité, France). Le  $^{64}\text{Cu}$  peut être quantifié sur la base de son émission gamma à 1345,75 keV, à partir d'un aliquote de la solution finale de  $^{64}\text{CuCl}_2$ . Les radionucléides contaminants, produits de sous-réactions, le  $^{61}\text{Co}$  ( $T_{1/2}=1,65$  h) et le  $^{65}\text{Ni}$  ( $T_{1/2}=2,5$  h) sont également identifiables et quantifiables lors de cette analyse, ce qui permet le calcul de la pureté radionucléidique finale.



*Figure 16. Exemple de spectre gamma obtenu par spectrométrie HPGe lors de l'identification du  $^{64}\text{Cu}$  et du contrôle de la pureté radionucléidique de la solution de  $^{64}\text{CuCl}_2$ .*

### II.3.6.2 *Mesure de l'activité*

L'activité de la solution est déterminée d'une part grâce aux données de l'analyse par HPGe (aliquote diluée) et, d'autre part, par la mesure de la solution de  $^{64}\text{CuCl}_2$  dans son contenant final à l'aide d'un activimètre calibré en intra et inter-laboratoire par rapport à l'HPGe.

### II.3.6.3 *Pureté radiochimique/activité spécifique*

La mesure des contaminants métalliques présents en solution est réalisée par ICP-OES sur un aliquote de la solution finale de  $^{64}\text{CuCl}_2$ . Une gamme d'étalonnage est au préalable réalisée pour chacun des métaux dosés. Les principaux contaminants observés sont le cuivre, le nickel et le fer. Le cobalt et le zinc peuvent être présents à l'état de traces mais les valeurs retrouvées pour ces deux métaux sont souvent inférieures au seuil de détection de la méthode analytique, qui est de l'ordre de 0,2 ppm.



# Métabolisme du cuivre

---

## I Rôle physiologique du cuivre

Le cuivre est le 3ème métal le plus abondant dans l'organisme humain après le fer et le zinc. Pour un individu sain de 70 kg, on estime la teneur en cuivre totale à 110 mg, répartie dans le foie (10 mg), le cerveau (8.8 mg), le sang (6 mg), le squelette (incluant la moelle osseuse; 46 mg), les muscles squelettiques (26 mg). A noter que le foie est le principal organe accumulant le cuivre, en terme de concentration (109).

Si le cuivre est en partie stocké dans le foie il est surtout présent sous forme fonctionnelle, associé à de nombreuses protéines en tant que cofacteur, permettant de catalyser des réactions enzymatiques d'oxydo-réduction. Ces protéines dépendantes du cuivre, également appelée cuproprotéines, exploitent le potentiel redox du cuivre ( $E^0\text{Cu(II)/Cu(I)} = 0,153 \text{ V}$ ) pour assurer le transport d'électrons (110). Elles sont distribuées dans tout l'organisme et sont impliquées dans des processus divers (voir tableau 8). Bien qu'étant présent à l'état de traces dans l'organisme, le cuivre est donc un élément vital. La dérégulation de son métabolisme ainsi que l'expression de cuproprotéines déficientes, surexprimées ou agrégées sont à l'origine de pathologies sévères, comme les maladies de Menkes et de Wilson (111).

Nom	Fonction biologique	Conséquence si déficiente ou *surexprimée ou **agrégée
<b>Amine oxydase</b>	Utilisation des amines ; homéostasie du glucose ; trafic des leucocytes	*L'hyperactivité de l'enzyme est détectée chez les patients atteints de diabète et par des maladies cardio-vasculaires
<b>Angiogénine</b>	Formation des vaisseaux sanguins	Malformation des vaisseaux sanguins
<b>ATP7A (Menkes)</b>	Maturation cuproprotéines et excrétion du cuivre des cellules (sauf hépatiques)	Maladie de Menkes
<b>ATP7B (Wilson)</b>	Maturation cuproprotéines et excrétion du cuivre des cellules hépatiques	Maladie de Wilson
<b>Céruleplasmine</b>	Activité ferroxidase requise lors du transfert du fer à la transferrine présente dans la circulation sanguine	Anémie
<b>Cytochrome c oxydase</b>	Génération d'ATP via la phosphorylation oxydative (respiration)	Acidose lactique congénitale
<b>Dopamine <math>\beta</math>-hydroxylase</b>	Production de catécholamines ; synthèse de norépinéphrine	Déséquilibre hypothalamique ; chute de tension ; déshydratation ; somnolence ; abaissement de la température corporelle
<b>Facteurs V et VIII</b>	Coagulation sanguine	Saignements
<b>Hephaestine</b>	Activité ferroxidase requise lors du passage du Fe des cellules intestinales dans la circulation sanguine	Anémie microcytique hypochromique
<b>Lysyl oxydase</b>	Pontage du collagène et de l'élastine aux matrices	Fragilité des tissus et vaisseaux ; emphysème ; dilatation anormale de la peau
<b>Métallothionéine</b>	Séquestration du cuivre excédentaire	Toxicité cellulaire
<b>Peptidylglycine- mono-oxygénase</b>	Bioactivation de peptides hormonaux	Déséquilibres hormonaux causant une rupture cardiaque et la mort embryonnaire
<b>Précurseur de la <math>\beta</math>-amyloïde</b>	Rôle physiologique inconnu	Forme familiale de la maladie Alzheimer
<b>Protéine Prion PrP</b>	Rôle physiologique inconnu	Encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles
<b>Superoxyde dismutase 1</b>	Annihilation des anions superoxydes	Dommages cellulaires causés par des produits réactifs dérivés de l'oxygène ; **agrégats - sclérose latérale amyotrophique
<b>Tyrosinase</b>	Production de mélanine	Albinisme

*Tableau 8. Fonctions biologiques et conséquences des anomalies d'expression des principales cuproprotéines de l'organisme. (111)*

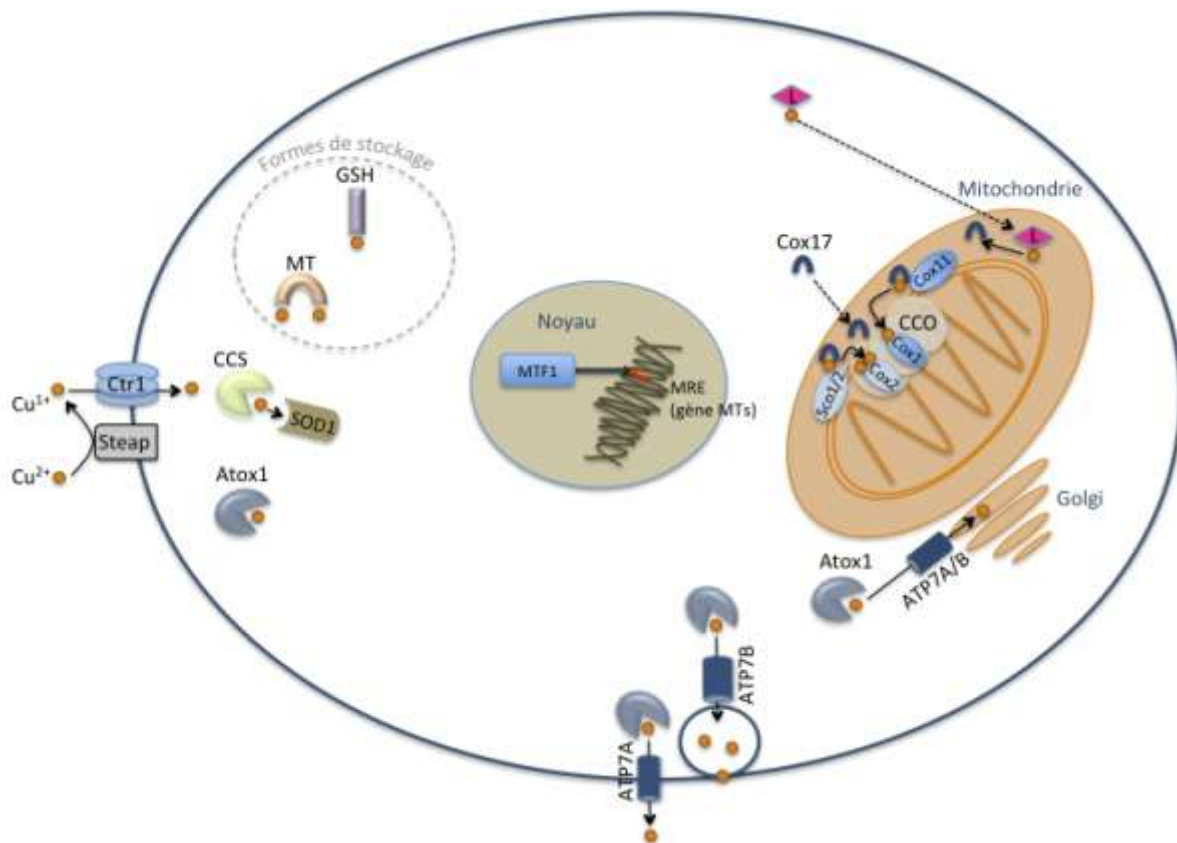
## II Prise en charge du cuivre au niveau cellulaire

Le métabolisme intracellulaire du cuivre (assimilation, distribution et régulation) a été particulièrement étudié chez les levures depuis plusieurs décennies. Les connaissances acquises ont pu être transposées et vérifiées chez les mammifères et chez l'homme grâce au degré important de conservation structurale et fonctionnelle des protéines impliquées dans le métabolisme du cuivre chez les organismes eucaryotes.

Malgré une compréhension globale relativement aboutie, le rôle de certaines protéines demeure hypothétique, d'autres sont à découvrir, de même que certains mécanismes de régulation.

Dans les environnements aérobies, le cuivre est principalement présent sous forme d'ions cuivrique ( $\text{Cu}^{2+}$ ). En présence d'anion superoxyde radicalaire ( $\text{O}_2\cdot$ ) ou de molécules réductrices telles que l'acide ascorbique ou le glutathion (GSH), l'ion cuivrique peut être réduit en ion cuivreux ( $\text{Cu}^{1+}$ ). Ce dernier peut être engagé dans la réaction de Fenton pour former le radical hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ) à partir du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (112). Les radicaux hydroxyles sont particulièrement délétères pour les cellules. Ils réagissent avec les lipides, les protéines et l'ADN, engendrant des modifications qui altèrent leurs fonctions. Etant donné son potentiel cytotoxique, le cuivre n'existe donc quasiment pas sous forme libre -  $\text{Cu(I)}$  ou  $\text{Cu(II)}$  - à l'intérieur des cellules (113).

Le cuivre est importé dans la cellule par un transporteur spécifique lié à la membrane cellulaire, le Ctr1 (copper transporter 1). Pour emprunter Ctr1, le cuivre est préalablement réduit de  $\text{Cu(II)}$  vers  $\text{Cu(I)}$ , probablement par l'intermédiaire de métalloréductases de la famille Steap (Steap2, Steap 3, Steap 4). La multimérisation de Ctr1 conduit à la formation d'un pore perméable à l'ion cuivreux. Celui-ci va pouvoir rejoindre le domaine intracellulaire via une série d'interactions avec des séquences d'acides aminés - des domaines transmembranaires de Ctr1 - liant le cuivre, sans consommation d'énergie sous forme d'ATP. Le cuivre est alors immédiatement pris en charge par des métalloprotéines spécifiques, les chaperonnes du cuivre, dont le rôle est de véhiculer le cuivre vers les structures intracellulaires, tout en limitant la toxicité induite par ce dernier (114,110,115).



*Figure 17. Importation et métabolisme du cuivre dans une cellule mammifère type.*

## II.1 Les chaperonnes du cuivre

### II.1.1 Chaperonne CCS

La CCS (Copper Chaperone for Cu,Zn Superoxide dismutase) est une protéine qui permet de délivrer et d'insérer le cuivre dans la SOD1 (superoxyde dismutase 1) ainsi que d'activer cette dernière, de la forme apo-SOD1 vers holo-SOD1 (116).

La SOD est une enzyme de faible masse moléculaire (32,5 kDa) qui forme des homodimères. Chaque monomère contient un ion de zinc qui joue un rôle structural et un ion de cuivre qui agit en tant que cofacteur catalytique. La SOD1 catalyse la transformation des anions superoxydes ( $O_2^-$ ) en peroxyde d'hydrogène et en dioxygène. Elle constitue ainsi une enzyme clé du processus de défense contre le stress oxydatif.

La CCS est constituée de 3 domaines. Elle s'ancre à l'apo-SOD1 par l'intermédiaire d'une homologie de structure sur son domaine II puis insère le cuivre dans le site actif et oxyde un pont disulfure de l'apo-SOD1, via le domaine III. Il en résulte l'holo-SOD1, soit la forme activée de

l'enzyme. Une anomalie de la CCS pourrait être une des causes de certaines formes de sclérose latérale amyotrophique (111).

### **II.1.2 Chaperonne Atox1 et mécanismes d'exportation du cuivre**

Le cuivre peut également se lier à la chaperonne Atox1. Celle-ci va alors être transférée vers l'appareil de Golgi où elle va s'associer avec des ATPases spécifiques du cuivre. Les protéines ATP7A et ATP7B sont des pompes permettant l'entrée du cuivre dans le lumen du compartiment sécrétoire. A ce niveau, le cuivre va être intégré - vraisemblablement sous forme libre - aux cuproprotéines telles que la céruloplasmine, la tyrosinase ou l'hephaestine, destinées à être sécrétées ou acheminées vers différents compartiments cellulaires. Par ailleurs, ATP7A et ATP7B jouent également un rôle clé pour exporter le cuivre en dehors de la cellule et assurer son déplacement au sein des tissus. Dans ce but, ATP7A et ATP7B peuvent être relocalisées au niveau de la membrane plasmique (114).

### **II.1.3 Chaperonnes Cox17, Cox11 et Sco1/2 et cuivre mitochondrial**

Un autre groupe de chaperonnes est impliqué spécifiquement dans l'introduction du cuivre dans la cytochrome c oxydase (CCO). La CCO est présente au niveau de la membrane interne des mitochondries où elle intervient comme le dernier complexe de transfert d'électrons de la chaîne respiratoire (complexe IV). Son rôle est crucial pour la production d'énergie par la voie de la phosphorylation oxydative. La CCO est formée de 13 sous-unités parmi lesquelles la Cox1 et la Cox2 intègrent respectivement un et deux atomes de cuivre (114). Le système d'approvisionnement en cuivre à la CCO est complexe et n'est pas encore totalement défini. Le cuivre serait acheminé à travers le cytosol et jusqu'à la mitochondrie par l'intermédiaire d'un ligand inconnu (noté « L » sur la figure 17). Une autre hypothèse consisterait en l'apport du cuivre dans la mitochondrie suite à la fusion entre le compartiment sécrétoire et les tubules mitochondriaux (117). Il est par contre établi qu'au niveau de l'espace inter membranaire mitochondrial, le Cu(I) se lie à la chaperonne Cox17. Celle-ci va transférer le cuivre vers Cox11 et Sco1/Sco2, ancrées au niveau de la membrane interne mitochondriale, assurant à leur tour le transfert du cuivre vers les sites Cox1 et Cox2 de la CCO, respectivement (115).

La mitochondrie pourrait également constituer un lieu de stockage du cuivre au niveau cellulaire, comme le suggère une étude ayant montré que la quantité de cuivre présente dans cette organelle est largement supérieure à la quantité nécessaire pour l'activation de la seule CCO (118).

#### II.1.4 Autres ligands intracellulaires du cuivre

Etant donné la criticité des processus biologiques mettant à profit les cuproprotéines, la cellule doit pouvoir stocker suffisamment de cuivre de sorte à pallier les éventuelles baisses de la biodisponibilité de ce dernier au niveau de l'organisme. Le pool de cuivre intracellulaire est en partie associé à des ligands tels que le glutathion (GSH) ou les métallothionéines (MTs), à partir desquels le cuivre peut facilement être mis à disposition des chaperonnes (114).

Le glutathion (GSH) est un tripeptide ubiquitaire, contenant une cystéine (d'où la notation SH correspondant à la fonction sulfhydryle de la cystéine) et jouant un rôle crucial dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène. Après l'entrée du Cu(I) dans l'environnement réducteur intracellulaire, le cuivre peut spontanément réagir avec la fonction thiol du GSH. Le complexe [Cu]GSH est suffisamment stable pour séquestrer le cuivre mais il peut facilement transférer celui-ci vers les chaperonnes et les cuproprotéines. Au-delà de sa fonction de stockage, le GSH est également impliqué dans la détoxification du cuivre au niveau cellulaire en transférant le cuivre vers Atox1 et les MTs. Il est également supposé que le GSH soit une alternative à Atox1 et CCS pour délivrer le cuivre aux pompes ATP7A /ATP7B et à la SOD1, respectivement.

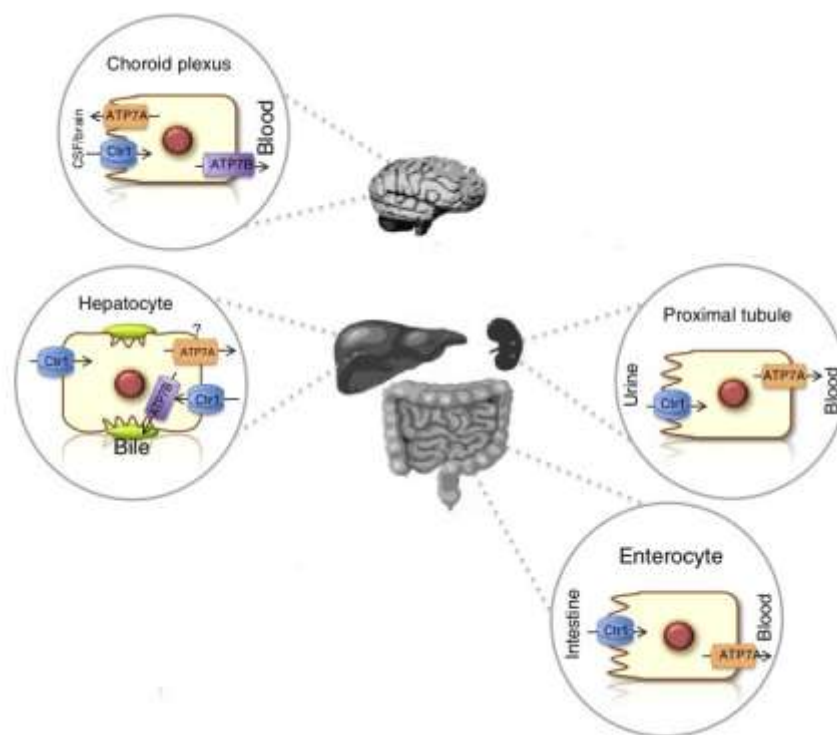
Les métallothionéines sont des petites protéines (env. 6 kDa) dépourvues d'acide aminés aromatiques et dont la structure primaire contient 20 répétitions de séquences riches en cystéines (Cys-X-Cys, Cys-Cys-X-Cys-Cys ou Cys-X-Cys-Cys). La structure secondaire de ces protéines est arrangée en deux domaines ( $\alpha$  et  $\beta$ ), séparés par une région centrale sans cystéine. Quatre isoformes de MTs ont été identifiées chez les mammifères (MT-1 à MT-4). L'ensemble des groupements sulfhydryles présents sur une MT permet de lier 12 cations métalliques monovalents ou 7 cations divalents. Bien que la forme initiale de la protéine contienne des cations Zn(II), ceux-ci peuvent être substitués par d'autres cations métalliques ayant une affinité plus grande pour les sulfhydryles. C'est le cas du Pb(II), Cu(I), Cd(II), Hg(II), Ag(I), Pt (II et IV), Pd(II). Cette propriété est mise à contribution pour moduler la toxicité des métaux lourds non essentiels (Pb, Hg, Cd etc.) (119).

A l'image du GSH, les MTs jouent à la fois un rôle dans la détoxification et le stockage du cuivre. En ce qui concerne la détoxification, l'expression des MTs est directement régulée par la concentration intracellulaire en cuivre via le facteur de transcription MTF1 (metal transcription factor 1). En réponse à une élévation de la concentration en cuivre, le MTF1 se concentre dans le noyau de la cellule et se lie au MRE (metal responsive elements) dans la région promotrice des gènes des MTs, ce qui permet d'induire rapidement leur synthèse. Concernant la fonction de

stockage, il est supposé que les MTs soient capables d'interagir directement avec les chaperonnes dans le but de leur transférer le cuivre et notamment dans un contexte de pénurie.

### III Homéostasie du cuivre

L'homéostasie du cuivre chez les mammifères est maintenue grâce à la balance entre l'absorption/distribution et l'excrétion biliaire et urinaire du cuivre. Le foie est l'organe central du métabolisme du cuivre dans l'organisme.



*CSF* : liquide cébrospinal (cerebrospinal fluid)

*Figure 18. Localisation membranaire des transporteurs du cuivre et direction des flux au niveau de différents types cellulaires : cellule du plexus choroïde (SNC), hépatocyte (foie), cellule du tubule proximal (rein), entérocyte (intestin). (114)*

#### III.1 Ingestion

Environ 0,6 à 1,6 mg de cuivre sont apportés chaque jour par le biais de l'alimentation. A ce pool s'ajoute plus de 4,5 mg de cuivre, provenant de la salive et la bile, qui sont secrétés dans le tractus digestif et en grande partie réabsorbés à ce niveau (109).

### **III.2 Absorption**

L'absorption du cuivre se fait au niveau du tube digestif, principalement dans le duodénum (environ 0,6mg par jour). Le cuivre - sous forme Cu(II) - est réduit au niveau de la membrane apicale des entérocytes puis est transporté en intracellulaire via Ctr1. Le Cu(I) interagit avec les différentes chaperonnes (et ligands) décrites précédemment pour être intégré aux cuproprotéines ou pour être dirigé vers l'ATP7A - située sur la membrane basolatérale de l'entérocyte - permettant de pomper le cuivre à l'extérieur de la cellule dans la circulation sanguine portale. Le cuivre va alors s'associer à des protéines plasmatiques de faible affinité, notamment l'albumine (65 kDa) ou certaines macroglobulines, dont la transcupréine (270kDa), qui assurent le transport du cuivre vers le foie et les reins (109,120).

Lorsque la biodisponibilité du cuivre est faible l'ATP7A se situe principalement au niveau de l'appareil de Golgi, mais lorsque les apports augmentent elle est relocalisée au niveau de la membrane basolatérale des entérocytes.

A noter que la mutation du gène de la protéine ATP7A est responsable de la maladie de Menkes. Les manifestations physiopathologiques de cette maladie sont liées à l'incapacité de pomper le cuivre à travers la membrane basolatérale des cellules de l'épithélium intestinal vers le sang ainsi qu'au niveau de la barrière hémato-encéphalique. Il en résulte une accumulation du cuivre au niveau intestinal ainsi qu'un approvisionnement insuffisant en cuivre vers les organes périphériques, de fait incapable d'activer les cuproprotéines. Les symptômes de la maladie de Menkes sont une neurodégénérescence progressive et des anomalies marquées du tissu conjonctif et des cheveux. L'incidence annuelle est de 1/300000 en Europe et le pronostic est sombre, le décès survenant en général précocement dans l'enfance (121).

### **III.3 Métabolisme hépatique**

Le foie est l'organe central de la régulation systémique de l'homéostasie du cuivre. Il assure les fonctions de stockage, d'incorporation dans les cuproprotéines de transport, de redistribution vers les organes périphériques, ainsi que d'excrétion du cuivre (114).

Le transporteur Ctr1 est situé au niveau de la membrane basolatérale des hépatocytes, assurant l'importation du cuivre depuis le sang vers les cellules. Comme dans les autres cellules, le cuivre est pris en charge par les chaperonnes et les ligands de stockage (GSH et MTs). L'ATP7B permet le passage du cuivre dans l'appareil sécrétoire du Golgi où il sera incorporé en grande partie à la céruloplasmine (151 kDa). Il s'agit d'une  $\alpha$ -2 glycoprotéine liant 6 atomes de cuivre, sécrétée dans la circulation sanguine et transportant 70 à 95 % du cuivre total. La fonction première de la céruloplasmine est d'oxyder le Fe(II) en Fe(III) (activité ferroxidase) et de transférer ce dernier



à la transferrine qui assure la distribution du fer vers les organes périphériques. Le métabolisme du cuivre est en fait étroitement lié avec celui du fer. Mis à part la céruloplasmine d'autres ferroxidases lient à la fois le cuivre et le fer. C'est le cas de l'hephaestine, du zyklopen ou encore de la GPI-Cp (glycosyl-phosphatidylinositol ceruloplasmine). Le fonctionnement de ces protéines est dépendant de l'incorporation du cuivre dans leur structure finale.

En cas d'augmentation importante du taux de cuivre dans l'hépatocyte, les formes de stockage peuvent arriver à saturation. Dans ce cas, l'ATP7B est recyclée de l'appareil sécrétoire vers le pôle biliaire de l'hépatocyte dans le but de pomper l'excédent de cuivre dans la bile. Cette dernière correspond à la voie d'excrétion principale du cuivre.

A noter que la maladie de Wilson est la conséquence de la mutation du gène de la protéine ATP7B. Le déficit fonctionnel en ATP7B entraîne une surcharge en cuivre que l'hépatocyte ne peut évacuer vers la bile. Ce cuivre excédentaire s'accumule dans le foie, lié aux métallothionéines et sous forme libre. Il n'est plus incorporé dans la céruloplasmine, ce qui entraîne une diminution voire un effondrement de son taux plasmatique. L'incidence de la maladie de Wilson est de 1/30 000 à 1/100 000 nouveaux cas par an en France. Les patients atteints peuvent présenter des formes hépatiques mais également neurologiques ou psychiatriques, l'accumulation du cuivre se produisant également au niveau du système nerveux central (SNC) (cf. III.5 p. 65) et oculaire (anneau péri-cornéen de Kayser-Fleisher). Contrairement à la maladie de Menkes, la maladie de Wilson peut être traitée avec efficacité, notamment en utilisant des chélateurs du cuivre : la D-Pénicillamine (Trolovol®) ou le triéthylènetétramine (Trientine®, sous ATU) (122).

### **III.4 Métabolisme rénal**

Le rôle des reins dans le métabolisme du cuivre est relativement limité lorsque la biodisponibilité de celui-ci atteint des valeurs normales. En effet, étant donné que le cuivre circule essentiellement sous forme liée à la céruloplasmine ou aux autres protéines de transport, la quantité de cuivre filtrée au niveau des glomérules est infime. Ctr1 est cependant exprimé à la fois au niveau des cellules des tubules contournés proximaux et distaux dans le but de réabsorber le cuivre filtré dans l'urine primaire, vers le sang. L'expression de Ctr1 dans les reins est augmentée en cas de pénurie systémique en cuivre. Dans le cas inverse, ATP7A est relocalisée au niveau de la membrane basolatérale de la cellule rénale, vraisemblablement pour la protéger d'un excès de cuivre en exportant celui-ci vers le foie à des fins de stockage ou d'excrétion dans la bile (114).

### **III.5 Métabolisme au niveau du système nerveux central**

Le développement et le fonctionnement normal du SNC nécessitent une régulation locale particulièrement fine de l'homéostasie du cuivre. Les deux situations extrêmes, à savoir une pénurie ou un excès de cuivre, rencontrées respectivement dans la maladie de Menkes et la maladie de Wilson, ont pour point commun une neurodégénérescence conduisant à la mort en l'absence de traitement. De nombreuses protéines essentielles sont dépendantes du cuivre, notamment la PAM (peptidylglycine-alpha-amidating monooxygenase) et la DBH (dopamine-beta-hydroxylase), cette dernière participant à la synthèse de la noradrénaline.

Ctr1 est fortement exprimé au niveau de la membrane apicale des cellules du plexus choroïde (III<sup>ème</sup> et IV<sup>ème</sup> ventricule cérébral). En cas de pénurie en cuivre, Ctr1 est surexprimé à ce niveau probablement pour augmenter la capture du cuivre depuis le liquide cébrospinal. ATP7A et ATP7B sont également exprimées dans de nombreuses régions du SNC - dont le plexus choroïde, les neurones de Purkinje et le cerebellum - respectivement au niveau de la membrane apicale et basolatérale. L'ATP7A permet d'exporter le cuivre vers le liquide cébrospinal pour qu'il puisse être distribué dans le SNC et être incorporé dans les cuproprotéines. L'ATP7B permet d'éliminer un excès de cuivre vers le sang. Pour rappel, le déficit fonctionnel de l'ATP7B dans la maladie de Wilson conduit à une accumulation du cuivre dans le SNC (114).

# Complexation du cuivre et radiomarquages au Cu-64

---

## I Caractéristiques chimiques du cuivre

Le cuivre (Cu) est un métal de transition de numéro atomique 29 et de configuration électronique [Ar] 3d<sup>10</sup> 4s<sup>1</sup>. Dépendamment de la présence de donneurs d'électrons adéquats, le cuivre peut exister sous 3 degrés d'oxydation (+I à +III) en solution aqueuse(123,124).

Au degré d'oxydation +I, le cuivre a une configuration diamagnétique (d<sup>10</sup>) et forme des complexes cinétiquement instables du fait de l'absence d'énergie de stabilisation du champ cristallin. Les complexes de Cu(I) vont préférentiellement être formés avec des ligands peu polarisables tels que les thioéthers, les phosphines, les nitriles, les isonitriles, les iodures, les cyanures ou les thiolates et présenter des géométries de coordination variées.

Le degré d'oxydation +II est la forme prépondérante du cuivre en solution aqueuse. Le Cu(II) présente une configuration électronique d<sup>9</sup> pouvant être stabilisée sous la forme de complexes par interaction avec des ligands tels que les amines, imines, pyridines, carboxylates ou thiols. Ces complexes peuvent présenter des géométries plan carré, pyramidale trigonale, pyramidale à base carrée ou octaédrique déformée. A noter que la configuration d<sup>9</sup> est à l'origine de complexes hexacoordinés ayant la particularité de présenter une élongation axiale ou une compression tétragonale, ce phénomène de déformation étant connu sous le nom d'effet Jahn-Teller. Les complexes de Cu(II) sont cinétiquement plus stables que les complexes de Cu(I), d'où l'utilisation privilégiée du degré d'oxydation +II pour la mise en œuvre des radiomarquages au <sup>64</sup>Cu.

Enfin, le degré d'oxydation +III est difficile à stabiliser sans la présence de ligands  $\pi$ -donneurs forts. Il est par conséquent relativement rare et n'est pas mis à contribution pour les radiomarquages au <sup>64</sup>Cu (125).

## II Caractéristiques des ligands et des complexes de cuivre

### II.1 Définition d'un ligand

Un ligand est un atome, un ion ou une molécule portant des fonctions chimiques donneuses d'électrons lui permettant de se lier à un ou plusieurs atomes ou ions centraux. L'interaction métal/ligand est du type acide de Lewis/base de Lewis et conduit à la formation d'une liaison

covalo-dative. L'association d'un ou de plusieurs cation(s) métallique(s) avec un ou plusieurs ligand(s) constitue un édifice qui se nomme complexe de coordination (ou simplement « complexe »). La denticité d'un ligand correspond au nombre de donneurs qu'il comporte au sein de sa structure.

Dans le cadre de l'imagerie phénotypique, les ligands peuvent être utilisés pour lier un radionucléide métallique à un vecteur d'intérêt. On parle alors de radiomarquage indirect, contrairement au cas de figure où le radionucléide est directement lié au vecteur de manière covalente. Le développement des ligands doit prendre en compte d'une part les caractéristiques chimiques de l'interaction métal/ligand et ligand/vecteur et d'autre part les caractéristiques biologiques du complexe formé, de sorte à obtenir le radiomarquage le plus stable possible sans altérer les propriétés biologiques du vecteur.

## ***II.2 Caractéristiques physico-chimiques idéales d'un ligand du cuivre***

### **II.2.1 Cinétique et rendement de complexation**

La cinétique de complexation, c'est à dire la vitesse à laquelle le cation métallique ( $\text{Cu}^{2+}$ ) est pris en charge et stabilisé par le ligand, doit être rapide. En effet, une cinétique rapide permet l'injection d'un radiopharmaceutique présentant une activité spécifique optimale et permet de recueillir un plus grand nombre d'informations lors de l'acquisition des images au temps tardif, d'où l'obtention d'un meilleur contraste. Ceci est particulièrement vrai si le radionucléide utilisé a une période radioactive courte en comparaison de la demi-vie de distribution biologique du vecteur.

La complexation du cation métallique par le ligand est un processus qui se fait pas à pas. La coordination d'un premier atome donneur (un azote par exemple) conduit au réarrangement de la sphère de coordination du métal. Suite à ce réarrangement, la coordination du centre métallique par un deuxième atome donneur nécessite un changement de conformation du ligand pour que le donneur soit suffisamment proche du métal, ce qui nécessite un apport d'énergie. Cette deuxième étape de coordination est en règle générale plus lente que la première et cinétiquement déterminante. La cinétique est d'autant plus lente que le ligand est rigide.

La cinétique de complexation peut être améliorée en augmentant le pH du milieu réactionnel. En effet, la protonation des atomes donneurs engendre des charges positives qui exercent une répulsion électrostatique du cation métallique et ralentit voire empêche sa complexation. De plus, il y a compétition entre la protonation des atomes donneurs et la complexation du cation

métallique par ces derniers. L'augmentation du pH permet de pallier cette situation, à condition de ne pas dépasser un pH de 9. En effet, au delà de ce pH, le cuivre précipite sous la forme d'hydroxydes. A noter que certains métaux (nickel et cobalt par exemple) contaminant la solution de  $^{64}\text{CuCl}_2$  précipitent à partir d'un pH plus faible, ce qui permet d'éviter qu'ils n'entrent en compétition avec le cuivre. Le pH de la réaction de complexation doit être compatible avec le domaine de stabilité du vecteur et si possible couvrir une large gamme (pH 4 à 9).

La cinétique d'une réaction de complexation peut également être accélérée en chauffant le milieu réactionnel. Cette possibilité ne peut cependant être envisagée que pour le radiomarquage de vecteurs supportant bien une température élevée (peptides, structures non Ig par ex.) mais ne convient pas aux anticorps ni aux fragments d'anticorps pour lesquels la réaction de complexation doit pouvoir se faire à une température inférieure à 40 °C.

En plus d'être rapide, la réaction de complexation doit également aboutir à un rendement important pour une faible concentration en ligand. Le nombre de ligands qu'il est possible de coupler à chaque vecteur est en effet limité sous peine d'altérer les propriétés biologiques du vecteur (cf. III.2 p. 75-76). Un rendement quantitatif (total) permet d'une part de s'affranchir d'une étape de purification finale et d'autre part d'optimiser l'activité spécifique.

## II.2.2 Sélectivité

La sélectivité pour le cuivre(II) vis à vis des autres cations métalliques divalents conditionne le rendement ainsi que l'activité spécifique du radiomarquage. En effet, la solution de cuivre-64 contient des traces de nickel(II) et de cobalt(II) - provenant du matériau de la cible ( $^{64}\text{Ni}$ ) et des réactions de transmutation parasites ( $^{61}\text{Co}$  et  $^{65}\text{Ni}$ ) - mais également d'autres cations métalliques divalents introduits en tant que contaminants au cours du processus de fabrication (II.1.1 p.42-44). Ces différentes espèces peuvent entrer en compétition avec le  $^{64}\text{Cu(II)}$  si la sélectivité du ligand n'est pas suffisamment élevée. Celle-ci est effective si les constantes thermodynamiques de formation du complexe de cuivre versus les complexes de métaux compétiteurs sont différentes de plusieurs log. En effet, même si les contaminants ne sont présents qu'à l'état de traces, ils sont néanmoins très majoritaires par rapport à la quantité de  $^{64}\text{Cu(II)}$  en solution : 1 GBq de cuivre-64 équivaut à seulement 0,1 nmol.

### II.2.2.1 *Evaluation de la sélectivité d'un ligand*

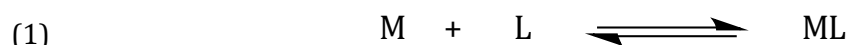
La sélectivité d'un ligand pour un cation métallique donnée vis à vis d'un cation d'un autre élément peut-être appréciée par le rapport des constantes de stabilité des complexes

respectivement formés. Pour prendre en compte l'ensemble des métaux contaminants potentiels, il est nécessaire de réaliser le suivi potentiométrique de la complexation de chacun de ces métaux par le ligand d'intérêt. Ce type de suivi est très chronophage et n'est que rarement réalisé pour d'autres métaux que celui à complexer. Une alternative consiste à réaliser un test de compétition en mettant le complexe radiomarqué - à l'aide du cation métallique d'intérêt - en présence de concentrations croissantes de métaux compétiteurs « froids ». La dissociation du complexe radioactif est classiquement suivie par CCM (chromatographie sur couche mince). Ce type d'étude présente l'avantage de pouvoir réaliser simultanément plusieurs gammes de compétition pour différents métaux.

## II.3 *Caractéristiques physico-chimiques idéales d'un complexe de cuivre*

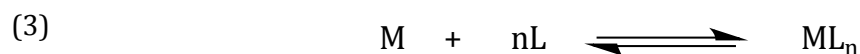
### II.3.1 **Stabilité thermodynamique**

La réaction de complexation d'un cation métallique par un ligand peut s'écrire selon l'équilibre (1) où M, L et ML symbolisent respectivement le métal, le ligand et le complexe résultant de l'interaction métal/ligand. D'après la loi d'action de masse, la constante de stabilité thermodynamique K, définie dans la relation (2), est le rapport des concentrations à l'équilibre du produit de la réaction (ML) et des réactifs (M et L) pris séparément.



$$(2) \quad K = \frac{[ML]}{M [L]}$$

Dans le cas d'un complexe formé par plusieurs ligands ou pour un ligand polydenté, on peut considérer l'équilibre général (3), où n est le coefficient stoechiométrique du ligand. La constante de stabilité thermodynamique globale  $\beta_n$ , est alors définie par la relation (4).



$$(4) \quad \beta_n = \frac{[ML_n]}{M L^n}$$

Le logarithme de  $\beta_n$  est directement relié à l'enthalpie libre  $\Delta G_r^0$  de la réaction par la relation (5).

La stabilité thermodynamique représente en effet la différence d'énergie libre entre le produit de la réaction (ML) et les réactifs (M et L) pris séparément. Elle est le reflet de la spontanéité de la réaction mais également de la stabilité de l'édifice de coordination, c'est à dire de l'énergie des liaisons covalo-datives mises en jeu entre le métal et le(s) ligand(s).

$$(5) \quad \Delta_r G^0 = -RT \ln(\beta_n)$$

Pour trouver des applications en médecine nucléaire, le complexe doit avoir une stabilité thermodynamique la plus grande possible. Celle-ci dépend à la fois de facteurs enthalpiques et entropiques. Parmi les facteurs enthalpiques, le métal et le ligand doivent présenter des propriétés électroniques similaires selon la théorie HSAB (hard and soft acid and basis). Le Cu(II) étant un acide intermédiaire il sera le plus adéquatement stabilisé par des atomes d'azote et d'oxygène (bases dures) voire de phosphore (base plus molle). Parmi les facteurs entropiques, l'augmentation de la denticité de même que des effets de structuration, tels que l'effet chélate et l'effet macrocycle, auront un impact positif sur la stabilité thermodynamique du complexe.

#### II.3.1.1 *Effet chélate*

L'effet chélate est un effet stabilisant qui s'observe lorsque les atomes donneurs (ou groupements d'atomes donneurs) d'un ligand sont reliés entre eux de sorte à pouvoir coordiner le cation métallique en formant des cycles à 5 ou 6 chaînons. Ces conformations correspondent en effet à une énergie de contrainte minimale selon que l'on considère respectivement un cation de petite ou de grande taille. Etant donné que la dissociation des liaisons entre le cation métallique et les donneurs d'électrons s'opère pas à pas au sein de la sphère de coordination, l'interconnexion des donneurs crée un effet coopératif. En cas de dissociation d'un donneur, celui-ci sera maintenu à proximité du centre métallique et pourra plus facilement re-coordonner le métal. Ainsi, l'augmentation progressive du nombre de cycles chélates au sein du complexe induit une augmentation de la constante de stabilité thermodynamique. A noter que pour un même nombre de cycles chélates, la stabilité thermodynamique sera également influencée par le rayon ionique du cation métallique ainsi que par le nombre d'atomes engagés dans chaque cycle (126).

#### II.3.1.2 *Effet macrocycle*

En plus de la contribution de l'effet chélate, la stabilité et l'inertie (cf. II.3.2 p. 71) d'un complexe métallique est augmentée lorsque celui-ci est formé à partir d'un ligand ayant une structure macrocyclique. Cet « effet macrocycle » a été mis en évidence en comparant les stabilités

thermodynamiques des complexes de cuivre formés par un ligand tetraazoté macrocyclique (5,7,7,12,14,14-hexaméthyl-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane) et son équivalent acyclique. Un gain de stabilité d'un facteur 10000 a été observé pour le ligand macrocyclique, résultant d'une stéréochimie plus adaptée vis à vis de la complexation du cuivre. Les ligands macrocycliques bénéficient en effet d'une meilleure pré-organisation de leurs atomes d'azote et de leurs doublets libres, dont l'orientation permet d'assurer un recouvrement plus efficace des orbitales du métal (127).

### II.3.1.3 *Mesure de la constante de stabilité thermodynamique d'un complexe*

Il existe de nombreuses méthodes pour déterminer les constantes de stabilité thermodynamiques partielles d'un complexe et aboutir à la constante globale, souvent exprimée sous sa forme logarithmique ( $\log\beta_n$ ). Les mesures peuvent être réalisées par titration pH-métrique, par spectroscopie (RMN ou UV-visible) ou encore par potentiométrie.

### II.3.2 **Inertie cinétique**

L'inertie cinétique est un paramètre qui reflète l'énergie d'activation nécessaire pour qu'un complexe se dissocie. Par conséquent, l'inertie cinétique détermine la facilité avec laquelle le cation métallique peut se retrouver sous forme libre en solution.

L'inertie cinétique d'un complexe peut être évaluée expérimentalement en mesurant son temps de demi-vie dans un acide fort et concentré. La dissociation du complexe est facilitée par les protons du milieu qui entrent en compétition avec le cation métallique pour être stabilisés par le ligand. A titre d'exemple, la dissociation du complexe peut intervenir suite à la protonation d'une ou de plusieurs fonctions amines participant à la sphère de coordination. Le suivi de la dissociation du complexe peut être réalisé par spectrophotométrie d'absorption UV-visible en mesurant l'absorbance à la longueur d'onde correspondant à la transition d-d de l'interaction métal-ligand.

## II.4 *Bifonctionnalité du ligand et couplage ligand/vecteur*

Le développement d'un radiopharmaceutique pour l'imagerie phénotypique-TEP implique de lier de façon stable un cation métallique radioactif (le  $^{64}\text{Cu}^{2+}$  par exemple) au vecteur d'intérêt. Pour ce faire, les ligands du cuivre sont utilisés en tant que groupements prosthétiques et nécessitent d'être rendus bifonctionnels. La première fonction du ligand est de complexer le cation métallique, avec les exigences décrites précédemment. La deuxième fonction consiste à



lier le ligand au vecteur par l'établissement d'une liaison covalente, en interposant généralement un bras d'éloignement aussi appelé « spacer ». Les sigles anglais BFA (bifunctional agent) et BFC (bifunctional chelator) sont souvent employés pour décrire ces ligands bifonctionnels. Les conditions réactionnelles mises en œuvres pour coupler le ligand bifonctionnel au vecteur doivent être compatibles avec les propriétés des deux entités, notamment en terme de stabilité. Par ailleurs, la réaction de couplage doit être rapide, si possible ne comporter qu'une seule étape et doit se faire avec un rendement important.

#### II.4.1 Les fonctions de couplage

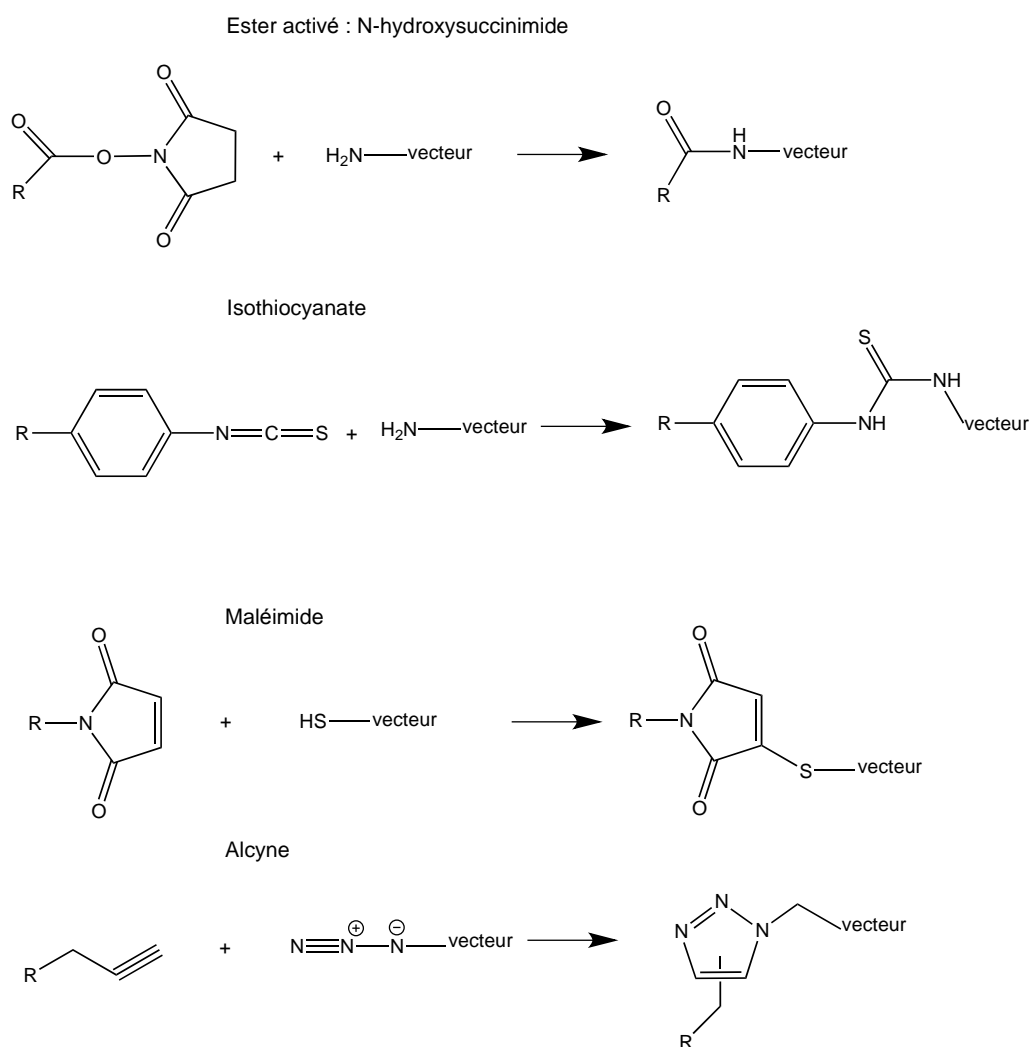
Le couplage du ligand bifonctionnel au vecteur peut être obtenu par l'intermédiaire de différentes fonctions réactives (128). Une fonction fréquemment mise à profit est l'ester activé. Celui-ci peut réagir avec une amine primaire du vecteur – au niveau de la chaîne latérale d'une lysine (amine  $\epsilon$ ) ou au niveau du résidu N-terminal dans le cas d'un peptide – et conduire à la formation d'une liaison peptidique très stable en conditions physiologiques. L'ester activé le plus couramment utilisé est l'ester de N-hydroxysuccinimide (NHS). Ce dernier est sélectif des amines primaires en milieu aqueux, à pH légèrement basique (pH 8) et permet de conjuguer indifféremment des peptides ou des anticorps.

La fonction isothiocyanates constitue une autre fonction de choix. Elle est également réactive vis à vis des amines en milieux aqueux, à pH 9-9,5, et conduit à la formation d'une liaison thiourée (voir figure 19). Du fait de ce pH réactionnel, cette fonction de couplage n'est compatible qu'avec les vecteurs stables en milieu alcalin.

La fonction maléimide réagit non pas avec les amines mais avec les groupements thiols du vecteur, au niveau des résidus cystéines. La réaction de conjugaison aboutie a une liaison thioéther, en milieu aqueux, à pH neutre. La fonction maléimide est par conséquent adaptée à tout type de vecteur biologique (129).

D'autres fonctions de couplages existent mais elles sont de loin moins employées que celles précédemment décrites. On peut citer la fonction dianhydride d'acide qui après couplage libère un acide carboxylique coordonnant, ce qui permet de maintenir la denticité du ligand d'origine. D'autre part, la « click chemistry » a récemment introduit une nouvelle possibilité de couplage via la réaction de cyclo-addition 1,3-dipolaire des alcynes avec les azotures. Cette réaction a pour avantage d'être douce et de conduire à de très bons rendements de couplage, tout en étant chimiosélective. Pour être utilisée comme réaction de couplage, les vecteurs doivent être préalablement modifiés avec des azotures pour pouvoir réagir avec des ligands comportant une fonction alcyne terminale (130). L'inconvénient principal de la réaction réside dans le fait qu'elle est catalysée par le cuivre(I). Dans le cadre de marquages au cuivre-64, il est en effet

difficilement envisageable d'introduire du cuivre froid dans la solution contenant le vecteur. Même si le degré d'oxydation I du cuivre n'est pas favorable à la complexation par les ligands utilisés et même si des lavages sont réalisés avant l'étape de marquage, les traces de Cu(I) sont susceptibles de diminuer drastiquement l'activité spécifique du marquage.



« R » représente la partie du ligand bifonctionnel assurant la complexation du cation métallique.

*Figure 19. Fonctions de couplage les plus courantes.*

## II.4.2 Intégrité des propriétés de complexation du ligand

L'introduction d'une fonction de couplage sur un ligand monofonctionnel peut être obtenue selon deux stratégies de synthèse. La première stratégie consiste à modifier un groupe fonctionnel existant, en le transformant en une fonction réactive, ou en lui en greffant une. Le cas de figure classique est la transformation d'une fonction carboxylate coordinante en un ester activé. La deuxième stratégie consiste à introduire une nouvelle fonction sur le ligand, soit au

niveau d'un atome coordonnant – généralement un atome d'azote – soit au niveau d'un atome non coordonnant – généralement un atome de carbone. On distingue ainsi la N-fonctionnalisation de la C-fonctionnalisation.

Ces différentes stratégies ont un impact plus ou moins important sur les propriétés de complexation du ligand. En ce qui concerne la première stratégie, celle-ci conduit à rendre non coordinante une des fonctions du ligand, c'est à dire à diminuer sa denticité. Ce type de modification est particulièrement préjudiciable pour la stabilité du complexe, en particulier si la denticité du ligand devient inférieure au nombre de coordination nécessaire pour stabiliser correctement le cation métallique.

Pour ce qui est de la N-fonctionnalisation, elle implique généralement la transformation d'une amine coordinante secondaire en une amine tertiaire, or cette dernière est un moins bon donneur d'électrons ( $\sigma$ ), d'où une diminution de la stabilité thermodynamique du complexe.

Dans le cas de la C-fonctionnalisation, on peut s'attendre à ce que les capacités complexantes du ligand demeurent inchangées puisque la modification du ligand ne touche pas un atome coordonnant. Cependant, la présence d'un groupement alkyle supplémentaire impose une certaine rigidité à la structure du ligand. Celle-ci pourra être moins bien adaptée à la sphère de coordination du métal, d'où également une perte de stabilité du complexe (131).

Si ces différentes stratégies d'introduction d'une fonction de couplage ont toutes un impact sur les propriétés de complexation, on privilégiera la C-fonctionnalisation à la N-fonctionnalisation et la N-fonctionnalisation à la modification d'une fonction coordinante. La difficulté de ces stratégies de synthèse évolue cependant en sens inverse : Il peut être très difficile de synthétiser un ligand bifonctionnel C-fonctionnalisé avec de bons rendements.

### **III Problématiques des radiomarquages au cuivre-64**

Les radiomarquages au cuivre-64 sont impactés par les problématiques générales des radiomarquages indirects mais également par des problématiques spécifiques liées à la stabilité des complexes de cuivre.

#### **III.1 *Approches de conjugaison***

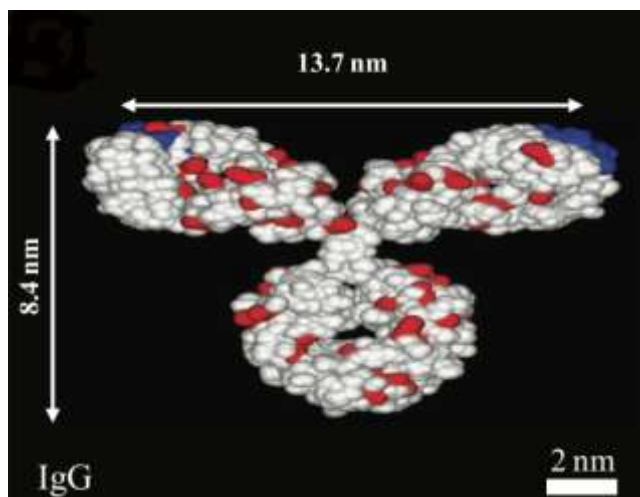
Deux approches peuvent être envisagées pour radiomarquer un vecteur à l'aide d'un ligand bifonctionnel. L'approche de pré-conjugaison consiste à réaliser la réaction de complexation du radionucléide avant le couplage à l'anticorps. Elle permet de caractériser le complexe et

d'obtenir une activité spécifique optimale. De plus, cette approche permet de réaliser la complexation en milieu non aqueux, si nécessaire. Cependant, la réaction de couplage n'étant généralement pas quantitative, il est nécessaire de réaliser une étape de purification. De même, le contrôle de l'immunoréactivité du vecteur suite au couplage doit être réalisé après le marquage. Ces différentes étapes sont chronophages et conduisent à une perte d'activité spécifique du radiopharmaceutique par décroissance, avant son utilisation.

L'approche de post-conjugaison est de loin celle la plus couramment mise en œuvre. Elle consiste à marquer le ligand déjà conjugué au vecteur. Afin d'obtenir une pureté radiochimique satisfaisante, il est nécessaire d'introduire le radionucléide en défaut par rapport à la quantité de ligand couplé au vecteur. Ceci a pour conséquence l'obtention d'une activité spécifique suboptimale. Le principal avantage de cette approche est qu'elle permet la préparation d'une trousse (ou kit). La préparation du radiopharmaceutique est ainsi grandement facilitée. Elle se déroule en une étape et consiste à introduire l'activité adéquate de radionucléide dans la trousse, en respectant les conditions de marquage (température, temps, pH). Aucune étape de synthèse supplémentaire ni de purification n'est nécessaire. Cette considération pratique prend tout son sens pour envisager une application médicale en routine.

### ***III.2 Impact du complexe sur le vecteur***

Une des problématiques des marquages indirects réside dans la diminution de l'immunoréactivité du vecteur suite au couplage avec le ligand bifonctionnel. En effet, les réactions de couplages décrites précédemment (cf. II.4.1 p. 72-73) ne sont pas régiosélectives. De ce fait, il est possible que les lysines ou les cystéines engagées dans la réaction avec le BFA soient situées au niveau du site de liaison/reconnaissance de l'antigène. Les petits vecteurs – peptides ou structures apparentées ou non aux Ig (cf. V.5 p. 31-34) – ont plus de chance d'être affectés par ce processus aléatoire puisque une plus grande proportion de leurs acides aminés est impliquée dans le site de reconnaissance antigénique. Les anticorps sont relativement épargnés par cette problématique – dépendamment de leur allotype – puisqu'ils comportent un nombre de lysines et de cystéines conséquent, notamment au niveau de leur fragment constant. Ainsi, une IgG standard comporte en moyenne 83 lysines relativement bien réparties au sein de sa structure (132) (voir figure 20).



*Les lysines sont représentées en rouge et les sites de reconnaissance antigénique bleu.*

*Figure 20. Structure d'un anticorps entier (IgG) et répartition des lysines. (132)*

La quantité moyenne de ligand qu'il est possible de coupler à un anticorps entier (en présence d'un excès de ligand de l'ordre de 10 à 100) est généralement inférieure à 5 ligands par anticorps. Cette donnée peut être mesurée à l'aide de radiomarquages tests (incubation du radio-immunoconjugué avec une gamme d'antigènes coatés sur des tubes) ou par mesures spectro-photométriques (133).

Un des moyens de pallier une perte d'immunoréactivité, notamment pour les petits vecteurs, consiste à réintroduire un domaine constant. Une alternative est de modifier les vecteurs en introduisant des résidus cystéines ou lysines en dehors du site de reconnaissance antigénique par la synthèse peptidique complète du vecteur. Cette technique n'est cependant envisageable que pour les vecteurs de moins de 10 kDa.

### **III.3 Stabilité des complexes de cuivre-64 *in vivo***

#### **III.3.1 Résistance à la transchélation**

Une des problématiques majeures de la stabilité des radiomarquages au cuivre-64 *in vivo* est la compétition qu'exercent certaines structures physiologiques pour complexer le cuivre-64 au dépend du ligand. A fortiori, les cuproprotéines sont particulièrement compétitrices puisqu'elles assurent le rôle de ligands physiologiques du cuivre. De plus, elles sont présentes en quantité macroscopique dans l'organisme, notamment au niveau du foie (cf. III.3 p. 63-64), d'où leur capacité à complexer les traces de cuivre-64 libre - résultant de la dissociation du complexe de

cuivre-64 – et à favoriser cette dissociation. Ce phénomène de compétition et d'échange du radionucléide complexé, entre un ligand exogène et des ligands physiologiques, est appelé transchélation. S'il s'agit d'une problématique majeure dans le cadre des marquages au cuivre, certains complexes de métaux radioactifs sont moins impactés car le métal qu'ils complexent ne joue pas un rôle physiologique aussi important que le cuivre et par conséquent n'ont pas de ligands physiologiques compétiteurs adaptés. Pour illustrer ce propos, on peut citer l'exemple des complexes d'indium-111 mis à profit pour le radiomarquage de peptides en imagerie TEMP. Une accumulation hépatique de l'indium-111 peut être observée, mais celle-ci est plus liée au métabolisme du vecteur qu'à une transchélation de l'indium (134).

Pour déterminer la nature de la radioactivité accumulée au niveau hépatique suite à l'injection de peptides ou d'anticorps radiomarqués au cuivre-64, une étude de métabolisme a été réalisée chez le rat avec le [<sup>64</sup>Cu]TETA-octréotide, un peptide radiomarké au cuivre-64 par l'intermédiaire d'un ligand macrocyclique tetraazoté (le TETA) (135). Cette étude de référence a montré que la radioactivité dans le foie (22 h après l'injection) correspondait à trois métabolites : une espèce majoritaire (69 %) ayant une masse moléculaire de 32 kDa ainsi que deux espèces de 150 kDa (7%) et de 11 kDa (24%) chacune. Ces métabolites correspondent en fait à trois cuproprotéines ayant transchélaté le cuivre : respectivement la SOD, la céruloplasmine et des isoformes de métallothionénines. Parmi ces cuproprotéines, la SOD apparaît donc comme la plus compétitrice pour les complexes de cuivre-64. Cependant, la localisation précise de la transchélation ainsi que son mécanisme précis ne sont pas connus. Les chaperonnes du cuivre jouent probablement un rôle dans ce processus, en prenant en charge le cuivre libre et en le transférant aux différentes cuproprotéines.

Une fois intégré aux cuproprotéines, le radionucléide suit le schéma général de l'homéostasie du cuivre. Une étude clinique pilote de RIT du lymphome, évaluant un anticorps marqué au <sup>67</sup>Cu (<sup>67</sup>Cu-2IT-BAT-Lym-1), a ainsi montré que 25 % de la dose injectée était fixée à la céruloplasmine 4 jours après l'administration. L'hypothèse formulée stipule que le <sup>67</sup>Cu se dissocierait du ligand - le BAT, un dérivé du TETA (voir figure 22) - au niveau du foie. Cette dissociation serait alors suivie de la formation du complexe [<sup>67</sup>Cu]céruloplasmine et de la sécrétion de ce dernier dans la circulation sanguine (136). On peut supposer qu'au temps 24 h la radioactivité était principalement transchélatée non pas au niveau de la céruloplasmine mais au niveau de la SOD. La période radioactive du cuivre-67 – environ 5 fois plus longue que celle du cuivre-64 – conduit cependant à observer les processus tardifs de prise en charge du radionucléide transchélaté.

Ces études confirment que les phénomènes de transchélation *in vivo* ont un rôle majeur dans l'instabilité des marquages au cuivre-64. L'accumulation de ce dernier dans les organes non ciblés par le radiopharmaceutique, en particulier dans le foie, est particulièrement préjudiciable

dans le cadre d'applications d'imagerie phénotypique TEP, puisqu'elle contribue à diminuer le contraste de l'image et à irradier de façon non maîtrisée les organes sains. Les complexes formés pour les radiomarquages au cuivre-64 doivent donc avant toute chose être résistants à la transchélation. Cette propriété est liée à la stabilité du complexe ainsi qu'à la fraction du métal susceptible de se dissocier. Par conséquent, les paramètres physico-chimiques les plus à même de prévoir le devenir du complexe *in vivo* sont l'inertie cinétique et dans une moindre mesure la constante de stabilité thermodynamique. Cette dernière, prise de manière isolée, n'est en fait pas très représentative de la résistance à la transchélation, comme cela a été observé pour des ligands à priori très stables d'un point de vue thermodynamique mais qui se sont avérés particulièrement labiles *in vivo* (137). Un moyen plus sûr pour évaluer la résistance à la transchélation consiste à incuber le complexe radiomarké dans un excès de sérum humain à 37°C. La dégradation du complexe et/ou sa dissociation - conduisant à la fixation du radionucléide libre sur les protéines plasmatiques - peut être suivie par des techniques chromatographiques au cours du temps.

### III.3.2 Résistance à la réduction

Une autre voie de dissociation du complexe de cuivre-64 *in vivo* correspond à la réduction du complexe de cuivre (138). Le potentiel redox  $E^0$  du couple Cu(II)/Cu(I) est en effet relativement bas (0,153 V/ENH). Si cette propriété explique que le cuivre est mis à contribution dans de nombreux processus d'oxydo-réduction dans l'organisme, elle représente néanmoins un inconvénient quant à la stabilité des marquages au cuivre-64. De nombreux systèmes redox physiologiques sont effectivement capables de réduire le Cu(II) en Cu(I), notamment les couples de coenzymes nicotiques (NAD<sup>+</sup>/NADH,H<sup>+</sup> et NADP<sup>+</sup>/NADPH,H<sup>+</sup>), qui possèdent le potentiel redox le plus bas de l'organisme (-0,32 V/ENH) (126). Le potentiel de réduction du complexe de cuivre-64 doit donc être le plus négatif possible pour qu'il soit hors d'atteinte de ces systèmes redox. Si le complexe est réduit, c'est à dire que le cuivre-64 se trouve sous forme <sup>64</sup>Cu(I), celui-ci a de très fortes chances de se décomplexer puisque ses propriétés électroniques (acide mou) ne lui permettent pas d'être convenablement stabilisé par le ligand (bases dures à intermédiaires) adapté au Cu(II).

La résistance des complexes de cuivre à la réduction peut-être évaluée *in-vitro* par voltammétrie cyclique. Cette mesure électrochimique consiste à faire varier le potentiel électrique jusqu'à réduction complète du complexe puis à inverser le sens de balayage du système pour revenir à la valeur de départ. La voltammétrie cyclique permet d'estimer le potentiel redox du complexe et d'observer s'il est ou non réversible. Pour qu'un complexe soit parfaitement résistant à la

réduction il doit être réversible, sachant que pour les meilleurs ligands on observe au mieux une quasi-réversibilité du système.

### III.3.3 Résistance à la transmétallation

Après injection intraveineuse d'un radiopharmaceutique marqué au cuivre-64, sa concentration sanguine est généralement inférieure à  $10^{-8}$  mol.L<sup>-1</sup> et la concentration en complexe radiomarqué est donc du même ordre de grandeur. Or, les cations métalliques échangeables, notamment le cuivre(II) et le zinc(II) sont physiologiquement présents à des concentrations de l'ordre de  $10^{-6}$  à  $10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> dans le plasma, soit jusqu'à plus de 1000 fois la concentration du complexe. Dans ces conditions, le complexe est susceptible de se dissocier rapidement par transmétallation, c'est à dire par échange entre le cuivre-64 et les métaux compétiteurs. La sélectivité du ligand pour le cuivre ainsi que son inertie cinétique sont donc particulièrement importantes pour assurer une résistance à ce mode de dissociation. Le cuivre-64 libre a en effet très peu de chance d'être re-complexer par le ligand et il sera inexorablement pris en charge par les cuproprotéines tel que décrit précédemment.

## IV Etat de l'art des ligands dédiés au cuivre

### IV.1 Ligands acycliques (aliphatiques)

#### IV.1.1 Les poly(amino carboxylates) acycliques

Les premiers ligands ayant été étudiés pour complexer le cuivre sont les poly (amino carboxylates) acycliques comme l'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) ou le DTPA (acide diéthylène triamine penta acétique). Bien que les complexes de cuivre formés avec ces ligands aient une stabilité thermodynamique importante ( $\log K_{\text{Cu-EDTA}}=18,7$  et  $\log K_{\text{Cu-DTPA}}=21,4$ ), ils se dissocient rapidement dans le serum humain *in vitro* (139).

#### IV.1.2 Les bis(thiosemicarbazones)

Les bis(thiosemicarbazones) sont des ligands tetradentés de type  $\text{N}_2\text{S}_2$  formant des complexes neutres et relativement stables avec le Cu(II). Le Cu-PTSM et le Cu-ATSM ont été particulièrement étudiés comme traceurs de la perfusion (myocardique et cérébrale) et de



l'hypoxie cellulaire, respectivement, en étant radiomarqués avec du  $^{64}\text{Cu}$  ou du  $^{62}\text{Cu}$  (140). Récemment, des dérivés bifonctionnels de bis(thiosemicarbazones) ont été développés pour permettre le radiomarquage indirect de vecteurs. A titre d'exemple, l'ATSM a été fonctionnalisé avec un phenylcarboxylate au niveau de l'azote terminal (voir « D » figure 21). Comme c'est le cas de l'ATSM, ce nouveau dérivé bifonctionnel complexe le cuivre rapidement à température ambiante. Les mesures électrochimiques réalisées avec le complexe de Cu(II) froid ont montré une réduction réversible du système. Par ailleurs, ce dérivé a été couplé à un vecteur peptidique dérivé de l'octréotide dans le but de faire la preuve de concept de son utilisation pour le marquage indirect de vecteurs (141).

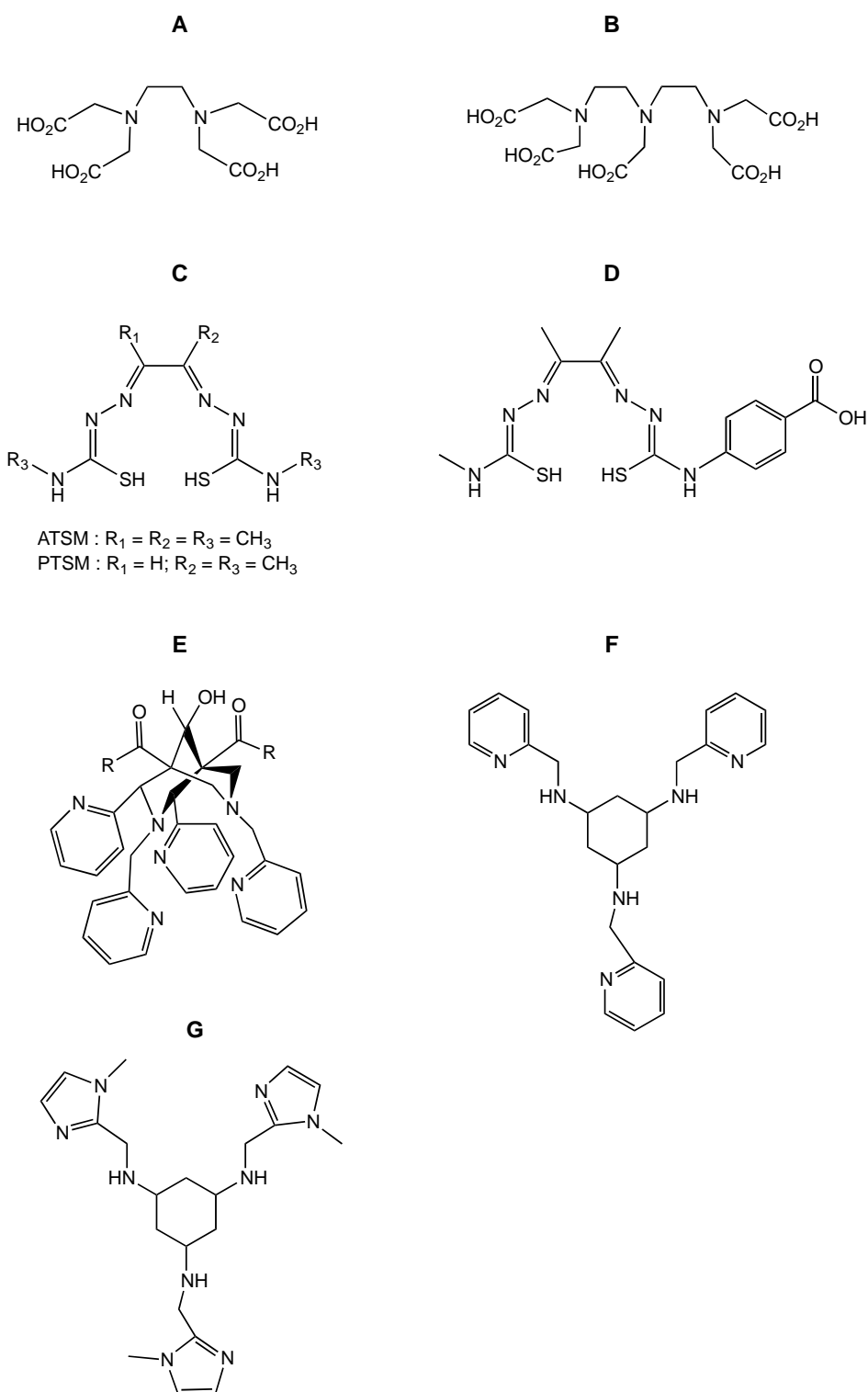
#### IV.1.3 Dérivés de la bispidine

Les dérivés de la bispidine (3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonane) ont également été développés comme ligands bifonctionnels pour la complexation du cuivre. Il s'agit de ligands hexadentés de type  $\text{N}_6$  présentant 2 azotes-amines et 4 azotes-pyridines (voir « E » figure 21). La présence du système bicyclique de la bispidine permet de rigidifier et de pré-organiser la structure du ligand et d'obtenir une stabilité thermodynamique comparable aux ligands macrocycliques tout en préservant une cinétique de complexation rapide. La complexation du cuivre se fait cependant en dehors du système bicyclique, c'est pourquoi les dérivés de la bispidine entrent dans la catégorie des ligands acycliques.

Un dérivé bispidine (voir « E » figure 21 ; R=O-Me ou OH) radiomarqué au  $^{64}\text{Cu}$  a notamment montré une stabilité sérique totale sur 24 h (142).

#### IV.1.4 Dérivés triaminocyclohexanes

Les dérivés du cis-1,3,5-triamino-cyclohexane (tach) ont initialement été étudiés pour les propriétés cytotoxiques et anti-angiogéniques des complexes qu'ils forment avec le Cu(II), Zn(II) et Fe(II)/Fe(III) (143–149). En ce qui concerne leur utilisation comme chélateurs du  $^{64}\text{Cu}$ , les ligands les plus prometteurs sont le tachpyr – dérivé du tach fonctionnalisé par 3 pyridines – et l'IM – dérivé du tach fonctionnalisé par 3 méthyle-imidazoles (voir « F » et « G » figure 21). Ces ligands complexent rapidement et quantitativement le  $^{64/67}\text{Cu}$  et sont stables plusieurs jours dans le sérum humain (étude réalisée avec le  $^{67}\text{Cu}$ ). La stabilité de ces composés n'a cependant pas encore été démontrée *in vivo*. De plus, la synthèse de dérivés tach bifonctionnels est problématique – perte de symétrie de la molécule, difficulté d'introduire une fonction réactive sur une localisation spécifique – expliquant à ce jour l'absence de preuve de concept de l'utilisation de cette famille de ligands en imagerie phénotypique-TEP (150).



*Figure 21. Ligands acycliques du cuivre : EDTA (A) ; DTPA (B) ; bis(thiosemicarbazones) (C et D) ; dérivés bispidine (E) ; tachpyr (F) et IM (G).*

## IV.2 Ligands mono-macrocycliques

Depuis la découverte de « l'effet macrocycle » en 1969, la chimie des macrocycles polyazotés n'a cessé de prendre de l'ampleur et de progresser pour aboutir à des stratégies de synthèse permettant de produire facilement et à faible coût les macrocycles de base et notamment ceux ayant un intérêt pour la complexation du cuivre : le tacn (1,4,7-triaazacyclononane), le cyclen (1,4,7,10-tetraazacyclododecane) et le cyclam (1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane) (voir figure 22). De nombreux ligands ont été synthétisés à partir de ces structures, en fonctionnalisant les atomes d'azotes par des groupements coordinants (donneurs anioniques oxo ou thiolato).

### IV.2.1 Dérivés carboxylates du cyclen, cyclam et tacn

Les ligands macrocycliques « chefs de file » sont les dérivés carboxylates : le DOTA (dérivé tetracarboxylate du cyclen), le TETA (dérivé tetracarboxylate du cyclam) et le NOTA (dérivé tricarboxylate du tacn). Il est intéressant de noter que malgré la différence de taille des macrocycles (12, 14 et 9 atomes respectivement), la complexation du cuivre par ces 3 ligands se traduit par des constantes thermodynamiques et d'inertie relativement proches (voir tableau 9 ci-dessous). La stabilité *in vivo* des complexes de <sup>64</sup>Cu formés par ces ligands ne peut donc être appréciée qu'en réalisant une mise à l'épreuve en conditions physiologiques, *in vitro* (stabilité sérique) et *in vivo* (étude de biodistribution).

	LogK <sub>CuL</sub>	Inertie cinétique en milieu acide, t <sub>1/2</sub> (conditions)	Potentiel de réduction (V) et réversibilité Cu(II)/Cu(I)
DOTA	22.7	< 3 min. (5M HCl, 90°C)	-0,74 (irréversible)
TETA	21.9	< 3 min. (5M HCl, 90°C)	-0,98 (irréversible)
NOTA	21.6	< 3 min. (5M HCl, 30°C)	-0,70 (irréversible)

D'après (151)

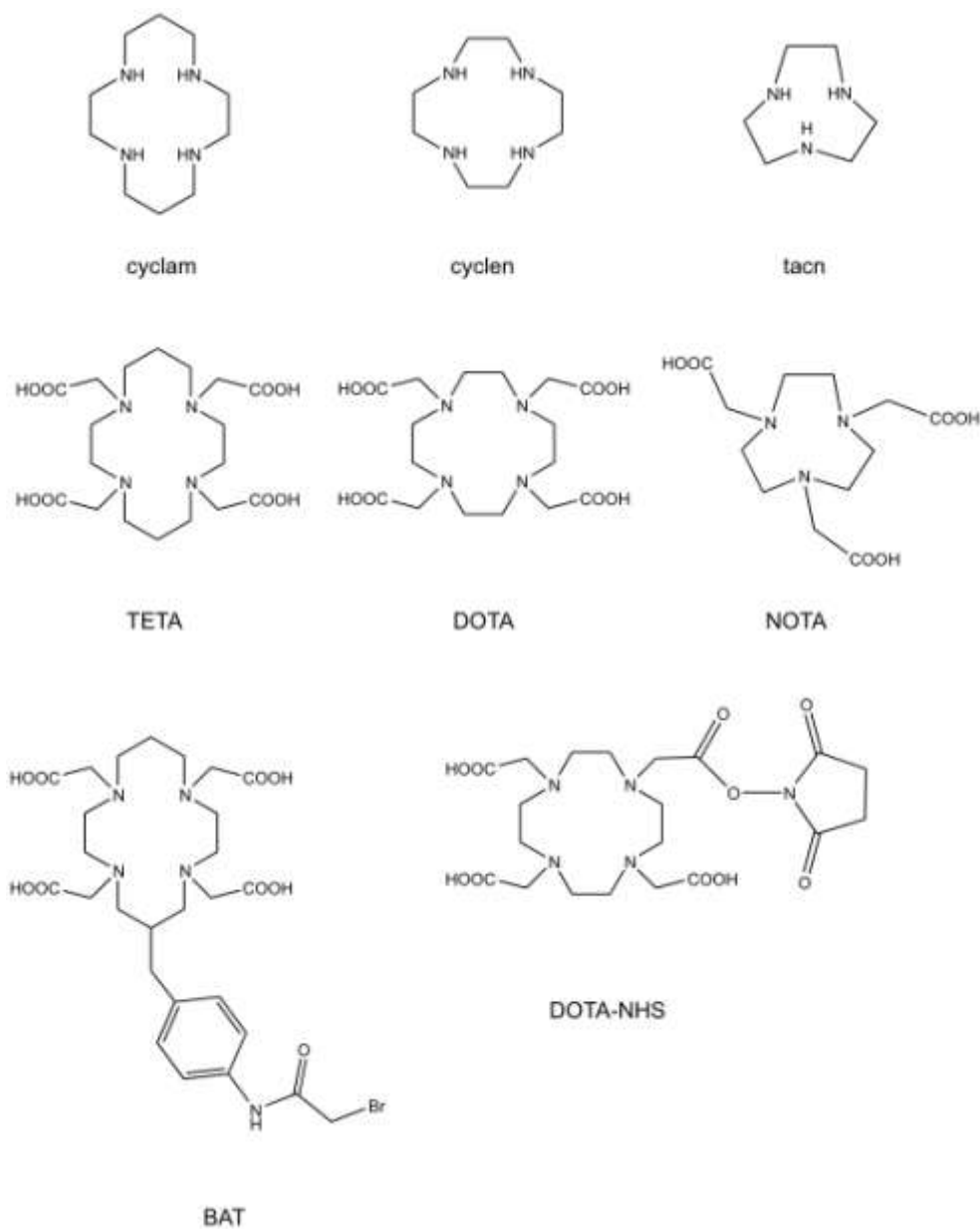
Tableau 9. Paramètres chimiques des complexes de cuivre formés par le DOTA, le TETA et le NOTA.

Le DOTA est sans conteste le ligand le plus utilisé pour radiomarquer des biomolécules au  $^{64}\text{Cu}$ , via ses dérivés bifonctionnels : DOTA-Ga ; p-NCS-Bz-DOTA ; DOTA-NHS ou encore l'ester maléimide-DOTA (152–158).

Comme évoqué précédemment, le DOTA est classiquement utilisé pour complexer d'autres radionucléides métalliques, notamment l' $^{111}\text{In}$  ou encore des lanthanides, tels que l' $^{90}\text{Y}$  et le  $^{177}\text{Lu}$ . De plus, le DOTA est mis à profit dans la spécialité DOTAREM® – un produit de contraste IRM – pour complexer le gadolinium (non radioactif). Cette polyvalence du DOTA va à l'encontre d'une des propriétés requises pour être un bon ligand du cuivre, à savoir une sélectivité importante vis à vis de ce métal. Par ailleurs, le complexe  $[\text{}^{64}\text{Cu}]\text{DOTA}$  n'est que modérément stable *in vivo*. Le manque d'inertie du complexe conduit à la démétallation du  $^{64}\text{Cu}$  et à une accumulation importante et durable de celui-ci au niveau du foie après transchélation vers les protéines hépatiques (159). Le DOTA présente néanmoins l'avantage d'être commercialement disponible sous forme GMP (Good Manufacturing Practice). Il est de ce fait largement utilisé dans le cadre d'essais cliniques d'imagerie phénotypique-TEP au  $^{64}\text{Cu}$  et constitue un ligand de référence pour comparer la stabilité *in vivo* de nouveaux ligands.

Comparativement au DOTA (cyclen), les 2 atomes de carbones supplémentaires du cyclam confèrent au TETA une meilleure pré-organisation de ses doublets libres ainsi qu'une cavité plus adaptée au rayon ionique du cuivre. Par conséquent, le TETA possède une meilleure inertie cinétique que le DOTA, ce qui se traduit *in vivo* par une transchélation significativement plus faible vers les protéines d'origine hépatique (159). Les dérivés bifonctionnels du TETA, notamment le BAT et le TETA-NHS (voir figure 22) ont été largement utilisés pour radiomarquer des anticorps et des peptides avec le  $^{64}\text{Cu}$  (160–164).

Le NOTA, dérivé du tacn, est principalement utilisé en imagerie phénotypique-TEP pour complexer le  $^{68}\text{Ga}$ . Des études récentes ont cependant montré que le NOTA, et ses dérivés, permettent de complexer efficacement le  $^{64}\text{Cu}$ . De plus, les complexes de  $^{64}\text{Cu}$  formés par ces derniers se sont révélés être plus stables *in vivo* – après couplage à un peptide – comparativement aux complexes formés à partir du DOTA et du TETA (165–167). Ces résultats suggèrent que le raisonnement basé sur la taille du macrocycle n'est pas suffisant pour prévoir le gain d'inertie cinétique d'un complexe apporté par l'effet macrocycle.



*Figure 22. Ligands macrocycliques tetraazotés dérivés du cyclam, cyclen et tacn.*

### IV.3 Ligands macrobicycliques

Au cours de la dernière décennie, une des voies d'amélioration de l'inertie cinétique des macrocycles tetraazotés a consisté à accroître la rigidité des ligands en développant des systèmes bicycliques. Ces derniers sont encore mieux préorganisés pour complexer le cuivre que leurs homologues mono-macrocycliques.

### IV.3.1 Dérivés pontés du cyclen et du cyclam

Les ligands macrobicycliques chefs de file, dérivés du cyclen et du cyclam, sont respectivement le CB-DO2A et le CB-TE2A (voir figure 23). Ces ligands sont de type « cross-bridge » (CB), c'est à dire que le cyclen ou le cyclam est ponté en trans, au niveau de deux azotes, par une chaîne alkyle (éthyle). Comme pour le TETA et le DOTA, les deux atomes d'azote vacants sont fonctionnalisés par des carboxylates, d'où la notation « 2A » signifiant 2 bras acétates. Les constantes thermodynamiques des complexes de cuivre obtenus avec les ligands pontés sont difficiles à mesurer en raison de leur forte affinité pour les protons mais il est admis qu'elles sont du même ordre de grandeur que celles des ligands non pontés. Du point de vue de l'inertie cinétique, le CB-TE2A se distingue par une demi-vie de 154 heures en acide chlorhydrique 5 M à 90°C (151). Après radiomarquage au cuivre-64, l'étude des complexes *in vivo* a montré un gain de stabilité important pour les complexes pontés comparativement à leurs analogues non pontés. Le CB-TE2A a en particulier montré une grande résistance à la transchélation comme le suggérait son inertie cinétique très importante (168).

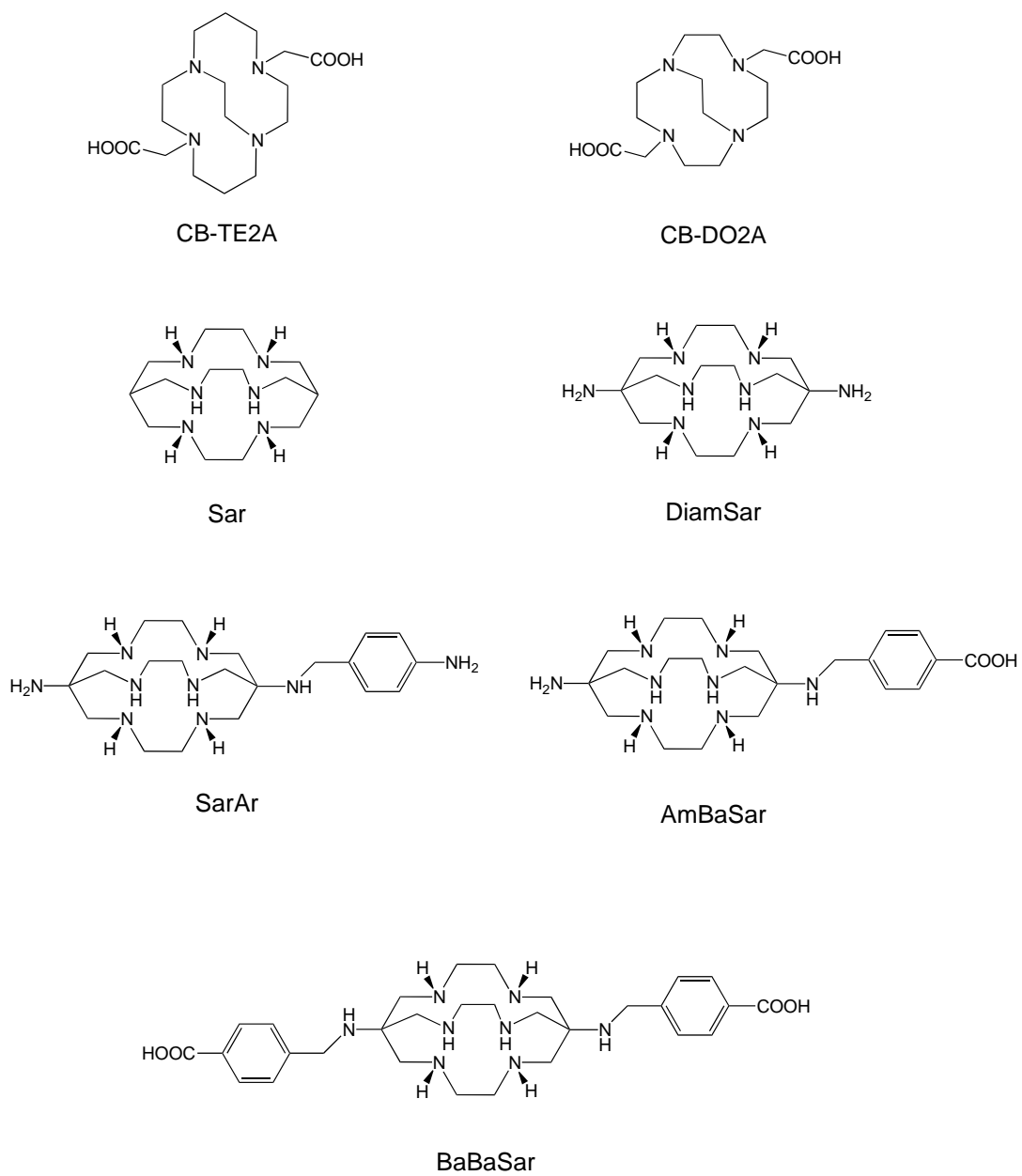
L'augmentation de la rigidité des ligands pontés n'a cependant pas que des avantages. La cinétique de complexation du cuivre est considérablement ralentie et le radiomarquage de ces ligands nécessite des conditions drastiques – chauffage à des températures supérieures à 80°C sur plus de 30 min – pour obtenir un rendement satisfaisant. Par conséquent, ces ligands ne peuvent pas être utilisés pour radiomarquer des anticorps ou d'autres biomolécules sensibles à la chaleur. C'est une des raisons pour lesquelles le CB-TE2A trouve relativement peu d'applications en médecine nucléaire malgré ses grandes qualités intrinsèques. Il a néanmoins été couplé à des peptides tels que la bombésine et des peptides cycliques de type RGD (169–172). La stabilité du marquage *in vivo* était en accord avec les très bons résultats observés pour l'injection du seul complexe  $[^{64}\text{Cu}]\text{CB-TE2A}$ . A noter que dans ces derniers exemples, le couplage ligand-vecteur s'effectue *in situ*, via l'une des deux fonctions carboxylates coordinantes du CB-TE2A. S'il a été montré que cette transformation n'affectait pas la stabilité *in vivo* (173), de véritables dérivés bifonctionnels du CB-TE2A ont récemment été synthétisés (NCS-Bz-CB-TE2A, par exemple) (174–176).

### IV.3.2 Sarcophagines

Les ligands hexaazamacrobicycliques, dérivés de la cage sarcophagine (Sar, voir figure 23), ont récemment attiré l'attention pour leurs caractéristiques très favorables de complexation du cuivre-64. La structure sarcophagine peut être décrite comme un dérivé du cyclam, avec un pontage comprenant 2 atomes d'azote, entre deux atomes de carbone du macrocycle. Le Sar peut

être synthétisé avec une pureté et des rendements importants, à bas coût. De plus, de nombreux dérivés ont été synthétisés en fonctionnalisant la cage, au niveau des atomes de carbones pontés, par divers groupements coordinants (NH<sub>2</sub>, OH etc.) ou permettant le couplage à une biomolécule vectrice. Les ligands de type sarcophagine encapsulent le cuivre(II) de manière tri-dimensionnelle d'où une stabilité thermodynamique élevée ainsi qu'une inertie cinétique très supérieure au complexe de référence [Cu]DOTA : 40 h dans l'acide chlorhydrique 5 M à 90°C (151). En effet, lorsque l'un des atomes d'azote se dissocie du centre métallique, la contrainte topologique induite par la cage sarcophagine permet d'assurer rapidement la recoordination du métal sans que le complexe ne puisse se dissocier entièrement (177). De plus, ces ligands sont capables de complexer quantitativement des concentrations micromolaires de cuivre(II) en quelques minutes, à température ambiante, et sur une large gamme de pH (4 à 9). Cette propriété est par ailleurs maintenue en présence de concentrations relativement importantes de métaux alcalins ou d'électrolytes, témoignant de la grande sélectivité des dérivés du Sar pour le cuivre.

L'obtention de rendements de radiomarquages importants à température ambiante (TA) constitue le principal avantage de cette famille de ligand en comparaison des autres ligands pontés et en particulier par rapport au CB-TE2A. Les ligands dérivés du Sar ne se limitent ainsi pas au radiomarquage des peptides thermo-résistants. A titre d'exemple, le ligand SarAr (voir figure 23) a été couplé à l'anticorps entier B72.3 ainsi qu'à son fragment F(ab')<sub>2</sub> (178). Les immunoconjugués obtenus ont pu être radiomarqués au cuivre-64 rapidement et avec un rendement quantitatif à TA. Leur stabilité *in vivo* s'est avérée très prometteuse. Sous leur forme non couplée, les complexes de cuivre-64 formés par les dérivés sarcophagines ([<sup>64</sup>Cu]Sar, [<sup>64</sup>Cu]DiamSar et [<sup>64</sup>Cu]SarAr ont également montrés une très bonne résistance à la transchelation *in vivo*, avec cependant une accumulation rénale relativement importante au temps précoce (179). A noter qu'en raison de la symétrie du Sar il est possible d'introduire deux fonctions de couplage, de part et d'autre de la cage. Les ligands ainsi obtenus (BaBaSar par exemple) permettent d'obtenir des radiopharmaceutiques multimériques, à base de peptides ou de vecteurs apparentés ou non apparentés aux Ig (cf. V.5 p. 31-34), s'accumulant de façon plus importante au niveau tumoral (180). En ce qui concerne les inconvénients de cette famille de ligands, on note, en plus de la tendance à une accumulation au niveau rénal, un manque de résistance à la réduction des complexes de cuivre *in vitro* (réduction irréversible) (151). Ce dernier point n'est pas nécessairement rédhibitoire mais doit être pris en compte pour orienter le choix du ligand, en fonction du devenir du vecteur *in vivo*.



*Figure 23. Ligands macrobicycliques tetra et hexaazotés.*



## **Développements cliniques de l'imagerie phénotypique au Cu-64**

---

A l'heure actuelle, six essais cliniques d'imagerie phénotypique-TEP ont été réalisés ou sont en cours d'investigation avec un vecteur immunologique marqué au cuivre-64 (156,164,181). En prenant en compte les essais cliniques ayant évalué des vecteurs peptidiques - à savoir des dérivés de la somatostatine - on dénombre huit études.

Le nombre d'essais clinique est donc relativement modeste mais il s'explique aisément par le regain d'intérêt récent que suscite l'imagerie phénotypique via la modalité d'imagerie TEP. Parmi les 8 essais cliniques mettant en jeu des mAb, présentés dans le tableau 10, on constate que la grande majorité ont démarré après 2007 et sont encore en cours d'investigation. L'essai clinique ayant évalué l'anticorps 1A3 marqué au cuivre-64 est la seule exception. Celui-ci a en effet été clôturé en 1994. Il a été rendu possible grâce à la production précoce de cuivre-64 d'activité spécifique importante au MURR, par capture de neutrons rapides (cf. II.2.2.2 p. 49). L'installation de cyclotrons ayant une énergie adaptée à la production du cuivre-64, au cours de la dernière décennie, explique la récente accélération de la recherche clinique en imagerie phénotypique-TEP au cuivre-64. Il faut également tenir compte du fait que le [<sup>18</sup>F]FDG a pendant longtemps laissé peu de place au développement clinique de nouveaux radiopharmaceutiques en oncologie.

Sur les six essais cliniques impliquant des mAb, quatre ont été réalisés avec des anticorps commerciaux, dont trois avec le trastuzumab. Ces derniers s'inscrivent plus dans le développement de l'imagerie phénotypique-TEP en tant qu'outil de sélection des patients éligibles à une thérapie ciblée (cf. III.3 p.21). A noter que pour l'une de ces études, le radiopharmaceutique est administré en cours de thérapie ciblée (trastuzumab à 2 mg/kg une fois par semaine ou à 6 mg/kg toute les 3 semaines). Dans ce cas, la finalité est donc plutôt de visualiser et quantifier l'accumulation de l'anticorps, c'est à dire de valider la pertinence de la thérapie ciblée et de réaliser son suivi.

Concernant l'essai clinique évaluant le rituximab radiomarqué au cuivre-64, un des objectifs est l'évaluation de la réponse au traitement par thérapie ciblée, en comparant l'accumulation du radiopharmaceutique dans la tumeur avant et après le traitement.

Par ailleurs, le rationnel des deux essais cliniques impliquant les anticorps non-commerciaux correspond plus au développement de l'imagerie phénotypique-TEP en tant qu'outil diagnostique.

Au final, toutes les composantes faisant l'intérêt de l'imagerie phénotypique-TEP sont représentées dans les essais cliniques en cours ou clôturés.

En ce qui concerne les marquages, on constate que la quasi totalité des mAb évalués dans ces essais cliniques ont été radiomarqués par l'intermédiaire du DOTA. Le BAT a été préféré au DOTA dans une seule étude, à savoir la plus ancienne, évaluant l'anticorps 1A3. Ce constat montre que le DOTA continue à être utilisé, du fait de sa disponibilité sous forme GMP, malgré que le manque de stabilité des marquages au  $[^{64}\text{Cu}]\text{DOTA}$  ait été objectivé chez l'animal. Ce manque de stabilité a pu être vérifié chez l'homme : Les résultats de dosimétrie publiés pour les essais cliniques réalisés avec les peptides dérivés de la somatostatine - marqués au cuivre-64 par l'intermédiaire du DOTA - montrent que la dosimétrie au niveau du foie est limitante (0,09 à 0,16 mGy/MBq (156,164)). Dans le cas de l'essai impliquant l'anticorps 1A3, les conclusions de l'étude mettaient en exergue la difficulté de détection des métastases hépatiques - l'un des sites métastatiques les plus fréquents du carcinome colorectal - du fait de l'accumulation de la radioactivité dans le foie (93). C'est dans ce contexte que l'utilisation de ligands plus résistants à la transchélation se justifie. Elle doit non seulement permettre l'amélioration des images - en augmentant le rapport signal sur bruit - mais également être à même de diminuer la dosimétrie aux organes sains et en particulier le foie.



## Conclusion

---

Compte tenu des connaissances et des pratiques médicales actuelles, l'imagerie phénotypique-TEP présente un intérêt certain dans le diagnostic et la prise en charge thérapeutique des patients en cancérologie. En étant pleinement intégrée à la routine clinique, l'imagerie phénotypique-TEP permettrait notamment de mieux sélectionner les patients éligibles à certaines thérapies ciblées – à base d'anticorps monoclonaux « nus » ou conjugués à un radionucléide émetteur  $\beta^-$  voire  $\alpha^-$  – et d'évaluer la réponse à ce type de traitement. Cette modalité d'imagerie présente également un intérêt pour le diagnostic de certains types de cancers pour lesquels les modalités d'imagerie morphologique ou métabolique usuelles sont peu contributives. Si les anticorps monoclonaux entiers demeurent des vecteurs de choix, une grande variété de vecteurs a été développée sur le modèle des immunoglobulines voire à partir de structures innovantes non apparentées à cette famille. Ces développements ont permis d'obtenir un arsenal de vecteurs ayant des propriétés pharmacocinétiques et de ciblage adaptés à un grand nombre de situations cliniques. De même, la multiplication des biomarqueurs d'intérêts en cancérologie permet d'envisager des applications toujours plus nombreuses à l'imagerie phénotypique-TEP. En tant que modalité d'imagerie nucléaire, celle-ci repose sur l'utilisation d'un radionucléide, dont les propriétés physiques et chimiques doivent satisfaire à de nombreuses exigences. Parmi les différents radionucléides émetteurs de positons disponibles, le cuivre-64 est un des plus adaptés à l'imagerie phénotypique-TEP. La production du cuivre-64 est actuellement bien maîtrisée – via la réaction de transmutation  $^{64}\text{Ni}(p,n)$  voire  $(d,2n)$  – et de nombreux cyclotrons sont ou seraient à même d'assurer son approvisionnement. Une AMM centralisée a d'ailleurs été délivrée en août 2012 pour la commercialisation du cuivre-64 en tant que précurseur (Cuprymina®, Sparkle S.r.l, EMEA/H/C/002136) (23).

Le radiomarquage d'un vecteur au cuivre-64 se fait de manière indirecte par l'intermédiaire de ligands bifonctionnels. Ces derniers doivent remplir un cahier des charges très exigeant pour envisager des applications d'imagerie phénotypique-TEP en routine clinique. Une des problématiques majeures des radiomarquages au cuivre-64 est le manque de résistance des ligands à la transchélation *in vivo*. Ce phénomène est d'autant plus important et complexe à éviter que le cuivre a un rôle physiologique crucial et par conséquent un métabolisme (hépatique) très efficient. Les ligands actuellement utilisés en pré-clinique voire en clinique ne remplissent pas tous les prérequis d'un ligand idéal et conduisent à l'obtention d'images phénotypiques ayant un contraste insuffisant, notamment en périphérie du foie puisque ce dernier accumule une proportion non négligeable de la radioactivité injectée. C'est dans ce

contexte que s'inscrit la nécessité de développer des ligands du cuivre plus performants et donc plus adaptés au radiomarquage avec le cuivre-64.

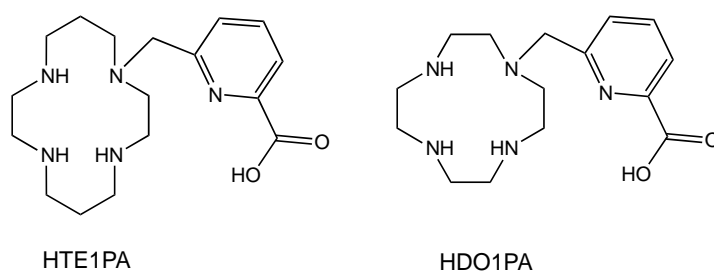
**Partie II : Développement d'un  
nouveau ligand macrocyclique  
tetraazoté spécifique du cuivre**

## Présentation des ligands fonctionnalisés picolinate(s)

---

L'acide picolique ou acide picolinique ou encore acide pyridine-2-carboxylique est un composé aromatique, constitué d'un noyau pyridine substitué par un groupe carboxyle en position 2. La base conjuguée de l'acide picolique est le picolinate. Ce dernier est connu pour être un bon ligand bidentate des métaux divalents, en particulier du chrome, du zinc, du fer, du cuivre, du nickel, du cadmium, du cobalt et du plomb (182). Le picolinate de chrome et le picolinate de zinc sont d'ailleurs couramment ajoutés aux compléments alimentaires à des fins nutritionnelles (183).

La fonctionnalisation des azamacrocycles par des bras coordinants picolinate a initialement été envisagée pour le développement de ligands capables de complexer les lanthanides(III), mais également le zinc(II), le cadmium(II), le plomb(II) et le strontium(II) (184). Les complexes obtenus sont particulièrement stables. De plus, ils sont solubles en milieu aqueux, ce qui constitue un prérequis essentiel pour une application biomédicale. Jusqu'à récemment, les dérivés fonctionnalisés par un ou plusieurs picolinate n'avaient pas été étudiés en tant que ligands polydentés du cuivre. Ce fut chose faite en 2011 avec un ligand acyclique, le dip (dipicolyl-carboxylate), permettant de complexer rapidement le  $^{64}\text{Cu}^{2+}$  mais également le  $\text{Co}^{2+}$  et le cœur technétium tricarbonyle  $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^{1+}$  (185).

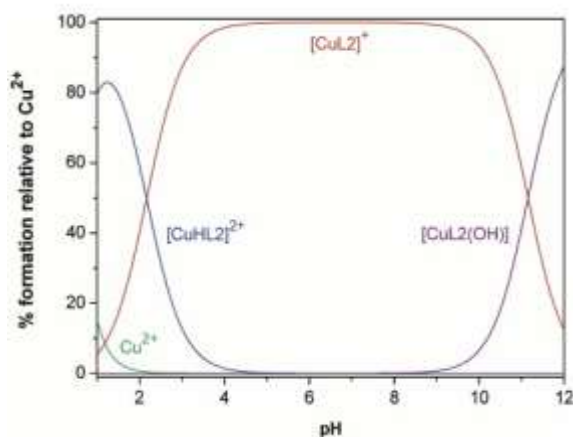


*Figure 24. Structure de HTE1PA et HDO1PA : ligands monopicolinate dérivés du cyclam et du cyclen.*

L'équipe ChASaM (Chélate Azotés Santé et Matériaux) de l'Université de Bretagne Occidentale à Brest a par la suite étudié les propriétés de complexation du cuivre(II) de deux ligands macrocycliques tetraazotés, dérivés du cyclen et du cyclam, fonctionnalisés par un bras monopicolinate (186). Ces ligands, respectivement le DO1PA et le TE1PA (voir figure 24) se sont avérés être des alternatives intéressantes aux dérivés macrocycliques tetraazotés

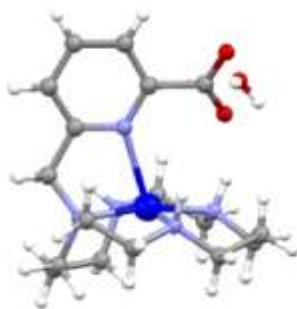
fonctionnalisés par des carboxylates, tel que le DOTA. A fortiori, le TE1PA a montré des propriétés de complexation satisfaisant à la plupart des exigences d'un bon ligand du cuivre :

- La cinétique de complexation du cuivre est très rapide et ce même à pH acide. On n'observe en effet plus de cuivre libre en solution au dessus de pH 2 (voir figure 25).
- Sa constante de stabilité thermodynamique ( $\log K_{MHiL}$ ) est de 25,5 pour le cuivre(II) et de 18,86 pour le zinc(II), d'où une très bonne sélectivité.
- La demi-vie du complexe  $[Cu^{2+}]TE1PA$  est de 32 minutes dans l'acide chlorhydrique 1 M et de 144 minutes dans l'acide perchlorique 5 M.
- Le complexe  $[Cu^{1+}]TE1PA$  généré par voltammétrie cyclique à pH 7,3 ne se dissocie que faiblement et le processus de réduction est quasi-réversible.
- La cristallographie par rayons X a montré que le bras picolinate participe à la sphère de coordination du cuivre(II) via son atome d'azote, en plus des 4 azotes du cyclam. La fonction carboxylate du picolinate est en revanche libre et permet d'envisager facilement l'insertion d'une fonction de couplage pour rendre le TE1PA bi-fonctionnel (voir figure 26).



*Figure 25. Diagramme de spéciation du Cu(II) en présence d'HTE1PA (L2).  $[Cu^{2+}]_{tot} = [L]_{tot} = 10^{-3} M$ . (186)*





Les atomes sont représentés tel que : cuivre (bleu), azotes (mauve), carbones (gris), hydrogènes (blanc), oxygènes (rouge).

*Figure 26. Structure tridimensionnelle du complexe [Cu]TE1PA.*

Le fait que la complexation du Cu(II) soit rapide à pH acide est particulièrement remarquable. En effet, les dérivés du cyclam fonctionnalisés au niveau de leurs atomes d'azotes par des bras coordinants complexent en règle générale assez lentement les cations métalliques. Les propriétés de coordination du bras picolinate sont à l'origine de cette cinétique de complexation rapide, or celle-ci est particulièrement importante dans le cadre des radiomarquages au cuivre-64. En tout état de cause, cette propriété ainsi que les autres caractéristiques favorables énoncées plus haut nous ont conduits à évaluer l'intérêt du TE1PA pour les radiomarquages au cuivre-64.

Cette étude a pu être réalisée dans le cadre d'une collaboration entre l'UMR INSERM 892 (équipe 13) du CRCNA (Centre de Recherche en Cancérologie de Nantes-Angers) et l'UMR CNRS 6521 (équipe ChASaM) de l'Université de Bretagne Occidentale.

La partie « Résultats » de cette thèse décrit ainsi la mise au point du radiomarquage au cuivre-64 du TE1PA ainsi que les études de stabilité *in vitro*, *in vivo*, et de métabolisme du complexe  $[^{64}\text{Cu}]$ TE1PA chez la souris BALB/c. Ce travail a été soumis à publication auprès de la revue « Journal of Nuclear Medicine and Biology », en octobre 2013 (cf. annexe 1).

## Matériels et méthodes

---

### I Synthèse du TE1PA

Deux voies différentes ont été développées pour synthétiser TE1PA facilement et avec un rendement important (voir figure 27). Chacune de ces voies met à profit une stratégie de N-protection différente afin de permettre la N-fonctionnalisation du cyclam avec un unique bras picolinate. La première voie a consisté à protéger le cyclam sous forme diformyl (**2b**), puis à le faire réagir avec un excès d'ester méthylique de l'acide 6-chloro-pyridine-2-carboxylique (**3**) pour obtenir le dérivé bisaminal **4a** sous forme de sel. La deuxième voie de synthèse a démarré par la triple protection du cyclam sous forme phosphoryle (**2b**). Ce dernier a ensuite été mis à réagir avec un excès de **3** pour obtenir le dérivé **4b**. Le ligand TE1PA a été obtenu respectivement après déprotection basique et acide des intermédiaires **4a** et **4b**, sous la forme HTE1PA (ligand protoné en solution). A noter qu'à partir du dérivé **4a**, une étape supplémentaire d'hydrolyse de la fonction ester était nécessaire.

Remarque : La partie « matériels et méthodes » exhaustive de la synthèse du TE1PA est disponible en annexe 1 (p. 120-121).

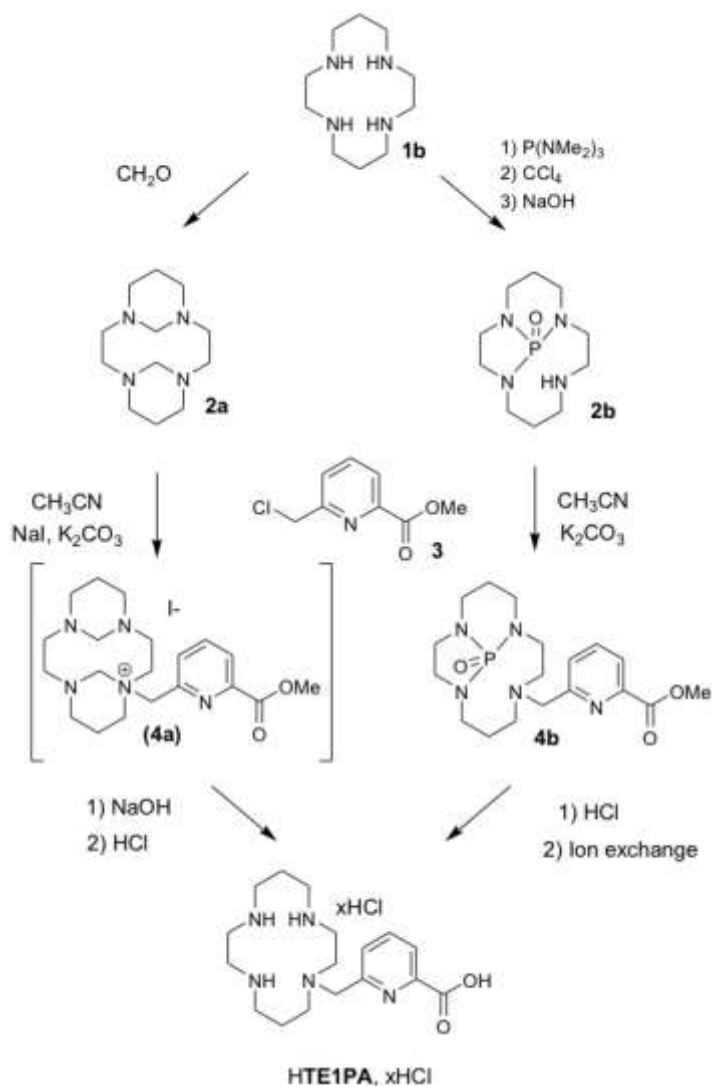


Figure 27. Voies de synthèse du TE1PA

## II Radiomarquage/radiochimie

### II.1 Réactifs et instrumentation

Le  $^{64}\text{Cu}$  a été obtenu auprès du cyclotron ARRONAX sous la forme de dichlorure de cuivre ( $^{64}\text{CuCl}_2$ ) en solution dans l'acide chlorhydrique 0,1 M. Avant libération de la source, la pureté radionucléidique et la pureté chimique ont été respectivement déterminées par spectroscopie gamma à l'aide d'un détecteur HPGe (DSPEC-JR-2.0 type 98-24B; AMETEK) et par ICP-OES (iCAP 6500 DUO; Thermo Fisher Scientific)

Les produits utilisés pour les solutions de radiomarquage – l'acétate d'ammonium, l'acide chlorhydrique 30%, les pastilles d'hydroxyde de soude – étaient tous de qualité ultra-pure (traceselect®) et fournis par la société Fluka Analytical. Les autres produits – HEPES, sel potassique d'HEPES, chlorure de sodium, acétate de sodium, acide 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacétique (DOTA), SOD recombinante (*E. Coli*), serum-albumine bovine (BSA) - ont été achetés en qualité conforme aux exigences de la société américaine de chimie (A.C.S reagents) auprès de Sigma-Aldrich. Les solvants - méthanol (HPLC grade) et acétonitrile (gradient grade) – ont été obtenus auprès de Fisher Chemical. L'éthanol absolu anhydre a été acheté chez Carlo Erba. L'eau utilisée pour l'ensemble des solutions a été obtenue avec une résistivité de 18.2 M $\Omega$ .cm via un système Gradient Milli-Q® de chez Millipore. Le serum humain a été fourni par la plateforme de biologie du CHU de Nantes. Les inhibiteurs de protéases – aprotine, leupeptine et Pefabloc (Pentafarm) – ont été obtenus sous forme d'aliquotes via le service commun de l'unité INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) UMR-892 de l'IRS-UN (Institut de Recherche en Santé de l'université de Nantes).

L'expérimentation animale a été menée en conformité avec la réglementation française, après autorisation par le comité d'éthique en expérimentation animale de la Région Pays de la Loire : numéro d'autorisation B-44-278 ; protocole n° CEEA.2012.271. Les souris – femelles, adultes, BALB/c sauvages – ont été obtenues auprès de l'éleveur Janvier (Le Genest St Isle, France). Ces souris ont été hébergées dans des conditions standard (régime alimentaire standard et eau *ad libitum*) et maintenues en quarantaine pendant 15 jours avant de démarrer l'expérimentation.

## II.2 *Analyses chromatographiques*

Les analyses CLHP (chromatographie liquide haute performance) ont été réalisées à l'aide de 2 systèmes chromatographiques différents. Le système CLHP n°1 est composé d'une colonne ACE C18 (3  $\mu$ m, 150 x 3 mm), d'un module CLHP Eckert&Ziegler, de 2 pompes Knauer K120, d'un dégazeur Knauer, d'un détecteur Knauer smartline UV 2520 ( $\lambda$  = 227 nm), d'un radio-détecteur blindé Eckert&Ziegler et du logiciel Modular-Lab. Le gradient d'élution associé à ce système comprend 3 phases : une phase isocratique avec 100% de tampon acétate à 0,05 M pH 4,5 sur 2,5 min ; une phase de gradient avec l'ajout de 0 à 10 % d'acétonitrile sur 15 min ; une phase isocratique avec 100 % d'acétonitrile. Le débit d'élution est de 0,5 mL/min.

Le système CLHP n°2 est composé d'une colonne d'exclusion stérique Superose 12 10/300 GL (GE Healthcare Life Science), d'un module de contrôle Waters 600, d'une pompe quaternaire Waters 600, d'un détecteur Waters 487 UV, d'un collecteur de fraction Gilson FC203B et du logiciel Empower pro 1154. L'élution est réalisée en mode isocratique avec une phase mobile

composée de tampon HEPES à 20 mM et de chlorure de sodium à 150mM (pH 7,3) à un débit de 0,5 mL/min, sur 60 min. Ce système a été préalablement étalonné avec 3 standards de masse moléculaire connue : la SOD bovine (32,6 kDa), la BSA (66 kDa) et une IgG (150 kDa). Les fractions collectées (1 tube/min) ont été comptées en fin d'analyse sur un passeur d'échantillon NaI(Tl) (Wallac 1480-Wizard® 3; Perkin Elmer).

Les analyses CCM (chromatographie sur couche mince) ont été réalisées sur des supports en plastique (feuilles de polyéthylène téréphtalate) recouverts d'un gel de silice (Fluka analytical). Deux éluents ont été utilisés : un mélange de chlorure d'ammonium à 20 % (dans l'eau) et de méthanol 1:1 pour le système CCM n°1 et un mélange d'acétate d'ammonium à 10 % (dans l'eau) et de méthanol 1:1 pour le système CCM n°2. Après migration, les plaques CCM sont mises à exposer 5 min sur un écran « storage phosphor screen ». L'écran est ensuite lu à l'aide d'un Cyclone® Plus (Perkin Elmer) permettant d'obtenir les radiochromatogrammes.

### II.3 *Radiomarquage des ligands*

Le TE1PA et le DOTA ont été radiomarqués en suivant le même mode opératoire, à ceci près que la température et la durée du marquage étaient différentes pour ces deux ligands. Concrètement, 50 µL de la solution de  $^{64}\text{CuCl}_2$  (40 à 60 MBq selon l'activité spécifique de la source; 10 ppm de cuivre pour 60 ppm de métaux totaux en moyenne) ont été ajoutés à 500 µL de solution de TE1PA ou de DOTA à 1 mM dans l'acétate d'ammonium 0,1 M. Consécutivement, 50 µL d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 M ont été ajoutés au mélange pour neutraliser l'acide chlorhydrique apporté par la solution de  $^{64}\text{CuCl}_2$ . Le mélange réactionnel ainsi obtenu a été mis sous agitation pendant 15 min à température ambiante (TA) pour le TE1PA et 30 min à 85°C pour le DOTA.

Le [ $^{64}\text{Cu}$ ]acétate a été obtenu en mettant sous agitation - pendant 30 min à TA - 50 µL de solution de  $^{64}\text{CuCl}_2$  additionnés à 500 µL d'acétate d'ammonium à 0,1 M et 50 µL d'hydroxyde de sodium à 0,1 M.

Le contrôle de la pureté radiochimique de la solution [ $^{64}\text{Cu}$ ]TE1PA a été effectué avec les systèmes CCM n°1 et CLHP n°1. Concernant la solution [ $^{64}\text{Cu}$ ]DOTA, le contrôle CCM a été réalisé avec le système n°2 et le contrôle CLHP avec le système n°1. Le [ $^{64}\text{Cu}$ ]acétate a été contrôlé avec l'ensemble de ces systèmes pour servir de témoin (migration du cuivre libre).

Le radiomarquage de la SOD a été obtenu en ajoutant 5 µL de solution de  $^{64}\text{CuCl}_2$  (4 à 6 MBq) à 50 µL d'acétate d'ammonium 0,1 M, 5 µL d'hydroxyde de sodium 0,1 N et 150 µL de SOD à 6,66

mg/mL dans du NaCl 0,9 M. Le mélange réactionnel a été agité à TA pendant 1 h et contrôlé à l'aide du système CLHP n°2.

### III Etude de stabilité *in vitro*

La stabilité du [<sup>64</sup>Cu]TE1PA a été évaluée dans le serum humain, *in vitro*, en comparaison au [<sup>64</sup>Cu]acétate. Pour ce faire, 200 µL de la solution de [<sup>64</sup>Cu]TE1PA ont été introduits dans 800 µL de sérum humain, en deux exemplaires. Un échantillon a été mis à incuber à 37°C alors que l'autre a été placé à 4°C, respectivement pour favoriser ou inhiber l'activité enzymatique. Le sérum témoin a été préparé de la même manière, en introduisant 200 µL de [<sup>64</sup>Cu]acétate dans 800 µL de sérum humain et en incubant cet échantillon à TA.

Deux contrôles chromatographiques ont été réalisés à 3 h, 12 h et 24 h après le début de l'incubation des échantillons. Un premier contrôle a consisté en une chromatographie d'exclusion stérique sur colonne à usage unique PD-10 (GE Healthcare Life Science). 100 µL de sérum ont été déposés sur la colonne puis celle-ci a été éluée avec 12 mL de tampon acétate 0,1 M (pH 5). L'éluât a été collecté en fractions de 500 µL. Ces dernières ont ensuite été mises à compter pour obtenir le profil d'élué. Ce contrôle a pour but de vérifier si le <sup>64</sup>Cu est toujours complexé par le TE1PA ou s'il s'est dissocié de ce dernier pour aller se fixer sur les protéines du sérum.

Un second contrôle a consisté en une analyse du sérum déprotéinisé par CLHP afin de vérifier la présence de produits de dégradation radiomarqués ainsi que de <sup>64</sup>Cu libre. Le sérum a été déprotéinisé en ajoutant 100 µL de solution de sulfate d'ammonium saturée à 100 µL de sérum dans un tube Eppendorf. Ce dernier a alors été vortexé puis centrifugé à 9000 tr/min pendant 2 min à TA. Après centrifugation, le surnageant et le culot ont été séparés puis comptés par spectrométrie gamma. Le surnageant a finalement été injecté, à raison de 20 µL, dans le système CLHP n°1.

### IV Etudes de stabilité *in vivo*

#### IV.1 *Biodistributions et pharmacocinétiques*

Pour étudier la biodistribution ainsi que la pharmacocinétique des complexes *in vivo*, 10 souris BALB/c femelles (poids : 20,4±1,2 g) ont été injectées avec 3,3-3,6 MBq de [<sup>64</sup>Cu]TE1PA (21,4

µg), de [<sup>64</sup>Cu]DOTA (19,8 µg) ou de [<sup>64</sup>Cu]acétate. La dose injectée a été diluée dans une solution d'acétate d'ammonium à 0,1 M pour un volume final injecté de 150 µL. Afin de calculer le plus précisément possible la dose injectée, les seringues ont été pesées avant et après administration. Dans chaque groupe, 4 souris ont fait l'objet de prélèvements sanguins, sur 24 h, pour l'étude de la pharmacocinétique ; ces animaux ont été sacrifiés à 24 h. Les autres souris du groupe ont été sacrifiées 2 h (n=3) et 24 h (n=3) après injection pour l'étude de la biodistribution au temps précoce et tardif, respectivement. Les animaux utilisés pour la biodistribution à 24 h ont également été placés en cage à métabolisme jusqu'à leur sacrifice afin d'étudier la répartition entre l'élimination fécale et urinaire. Après le sacrifice, les animaux servant à l'étude de la biodistribution ont été disséqués pour isoler et collecter le sang ainsi que les principaux organes dans des tubes à hémolyse. Ces différents organes ont ensuite été pesés puis comptés par spectrométrie gamma. Le nombre de coups mesuré dans chaque organe a été corrigé de la décroissance et rapporté au nombre de coups correspondant à l'activité totale injectée. Pour ce faire, un standard a été préparé en diluant 150 µL de solution radiomarquée, soit la même activité que celle injectée aux animaux, dans un volume total de 100 mL d'acétate d'ammonium 0,1 M à l'aide d'une fiole jaugée. Trois aliquotes de cette solution standard ont ensuite été systématiquement comptés avec chaque série d'organes ou de prélèvements sanguins, dans le but d'exprimer l'activité présente dans chaque échantillon en pourcentage de dose injectée par gramme (%DI/g). Etant donné que le volume exact de solution injectée était connu par pesée, le biais correspondant à l'incertitude sur l'activité injectée a pu être supprimé en appliquant un facteur de correction prenant en compte le volume injecté à l'animal ainsi que le volume utilisé pour préparer le standard.

<i>Groupes</i>		Pharmacocinétique : prélèvements sanguins à 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 12 h, (18 h), 24 h	n=4
• [ <sup>64</sup> Cu]TE1PA	n=10/ groupe	Biodistribution à 2h + étude de métabolisme	n=3
• [ <sup>64</sup> Cu]DOTA		Biodistribution à 24h + hébergement en cage à métabolisme	n=3
• [ <sup>64</sup> Cu]acétate			

*Tableau 11. Répartition et effectifs des animaux dans chacun des groupes d'étude in vivo.*

## IV.2 Métabolisme

Le devenir métabolique du  $[^{64}\text{Cu}]\text{TE1PA}$ , du  $[^{64}\text{Cu}]\text{DOTA}$  ainsi que du  $[^{64}\text{Cu}]\text{acétate}$  a été étudié dans le foie en s'inspirant de la méthode décrite par Bass et al (135). La moitié du foie des animaux sacrifiés 2 h après injection a été rincée avec du sérum physiologique à 0°C puis homogénéisée, sur glace, à l'aide d'un appareil de potter – piston en PTFE et inox adapté aux tubes de type Falcon de 15 mL (Fisher Scientific) – dans 1,5 mL d'un mélange éthanol/acétate d'ammonium 0,1 M en proportion 65 : 35 et contenant des inhibiteurs de protéase (aprotinine à 5 µg/mL, leupeptine à 5 µg/mL et AEBSF à 4 mM). L'homogénat de foie a été centrifugé à 23500 g et 4°C pendant 30 min avec une ultracentrifugeuse Optima™TLX (Beckman Coulter) équipée d'un rotor TLA110. Le surnageant et le culot ont ensuite été séparés puis comptés, de sorte à pouvoir déterminer le rendement d'extraction. Le surnageant a finalement été filtré (0,45 µm) avant d'être analysé via le système CLHP n°2 (200 µl injectés) et le système CCM n°1. Concernant l'analyse CLHP, une balance de l'activité injectée vs. éluee a été réalisée pour chaque échantillon en comptant 200 µL de l'échantillon injecté (standard) à la suite des fractions éluées, puis en comparant la somme du nombre de coups présents dans l'ensemble des fractions au nombre de coups présents dans le standard.

## V Analyse statistique

Afin de déterminer si deux séries de données étaient significativement différentes, un test de Student de comparaison de 2 moyennes (non appariées) a été réalisé avec un risque de première espèce de 5%. Sauf indication contraire, les hypothèses formulées pour ces tests étaient bilatérales.



# Résultats

---

## I Synthèse du TE1PA

### I.1 Voie cyclam diformyle

De façon surprenante, le réactif électrophile (**3**) (voir figure 27) n'a pas permis d'obtenir la trans-di-N-alkylation comme cela est généralement observé dans les conditions mises en oeuvre. L'addition de iodate de sodium était nécessaire pour activer la réaction qui a uniquement conduit à la formation du dérivé mono-ammonium. Le composé **4a** précipitait au fur et à mesure qu'il se formait et a pu être isolé dans un mélange de sels (NaCl et NaI). Après un traitement par NaOH et une extraction, le dérivé déprotégé non stable (sous forme d'ester de méthyle) a été directement hydrolysé avec de l'HCl 4M pour obtenir l'HTE1PA avec un rendement global de 58 %.

### I.2 Voie cyclam phosphoryle

Le composé **2b** a été engagé dans une réaction avec **3** pour obtenir le dérivé protégé **4b** avec un rendement de 74 %. Le ligand HTE1PA a finalement été isolé avec un rendement global de 55 % après déprotection complète des groupements phosphoryl et methyl ester avec de l'HCl 4 M.

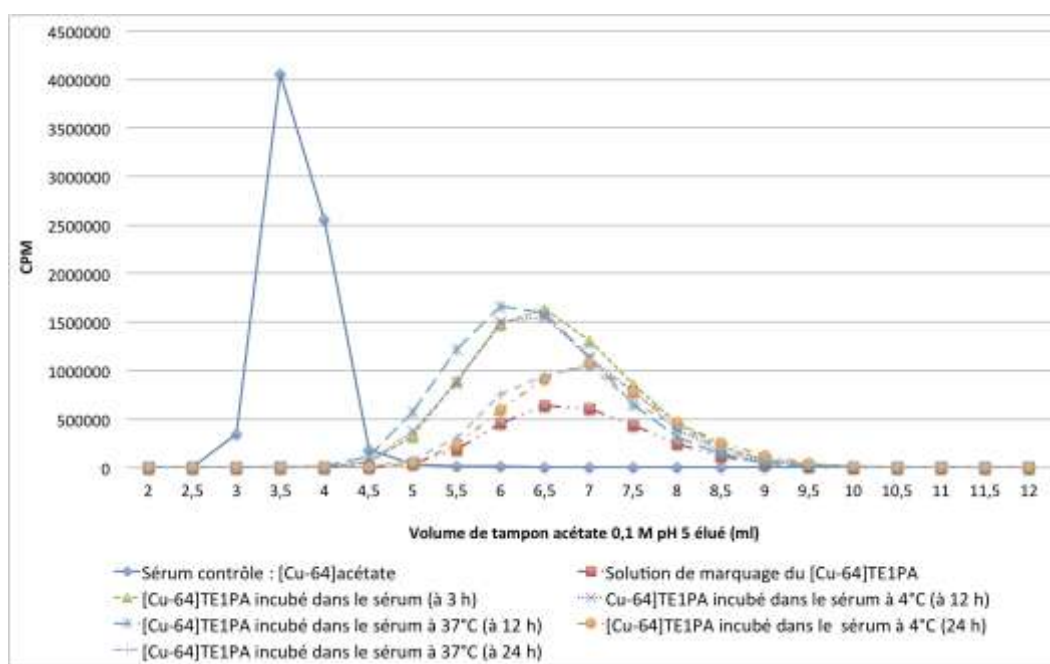
## II Radiomarquage des ligands

Le radiomarquage du ligand HTE1PA a pu être obtenu en moins de 15 minutes à TA. Les radiochromatogrammes – CCM et CLHP – de la solution de marquage montrent la présence d'une seule espèce présentant un rendement de radiomarquage supérieur à 99% (voir figure 29 et 30). Ceci confirme les résultats préalablement obtenus pour la complexation du cuivre(II) froid par l'HTE1PA, ayant été décrite comme rapide à TA et pour un pH supérieur à 2 (186). De plus, les radiomarquages tests, réalisés avec des concentrations en ligand décroissantes, ont montré que l'HTE1PA pouvait être radiomarké avec un rendement de 95% à une concentration de 0,01 mM. Dans ces conditions, le ratio HTE1PA/métaux totaux était inférieur à 1, ce qui démontre une importante sélectivité d'HTE1PA pour le cuivre(II) vis à vis des cations

métalliques divalents présents en solution ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  ou  $\text{Zn}^{2+}$ ). En ce qui concerne le DOTA, un rendement de radiomarquage supérieur à 99 % a également été obtenu avec une concentration en ligand de 1 mM, mais en chauffant à 80°C pendant 30 min. A la concentration de 0,025 mM – avec un ratio DOTA/métaux totaux de 0,6 – le radiomarquage n’était plus quantitatif (75 % de rendement).

### III Etude de stabilité *in vitro*

Dans cette étude, nous avons cherché à démontrer que les complexes de cuivre-64 formés par l’HTE1PA étaient stables en conditions physiologiques. A cette fin, la stabilité du complexe a tout d’abord été évaluée *in vitro*, en incubant le  $^{64}\text{Cu}$ ]TE1PA dans du sérum humain et en réalisant divers contrôles chromatographiques sur 24 h.



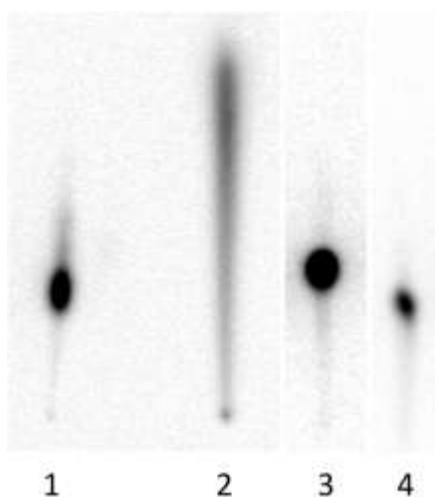
**Figure 28.** Profils de chromatographie d’exclusion stérique des échantillons de sérum incubés avec le  $^{64}\text{Cu}$ ]TE1PA à 4°C ou à 37°C comparés aux profils du sérum contrôle ( $^{64}\text{Cu}$ ]acétate incubé dans le sérum) et de la solution de radiomarquage du  $^{64}\text{Cu}$ ]TE1PA.

L’analyse du sérum par chromatographie d’exclusion stérique a montré, tout au long de l’étude, la présence d’un seul pic chromatographique, élué à 6,5-7 mL (voir figure 28). Ce pic correspond au complexe sous sa forme intacte et coïncide parfaitement avec celui observé pour la solution de marquage ( $^{64}\text{Cu}$ ]TE1PA). De plus, aucune activité n’a été éluée dans le volume précoce (3 à 4,5 mL) – correspondant aux masses moléculaires des protéines sanguines– comme c’est le cas

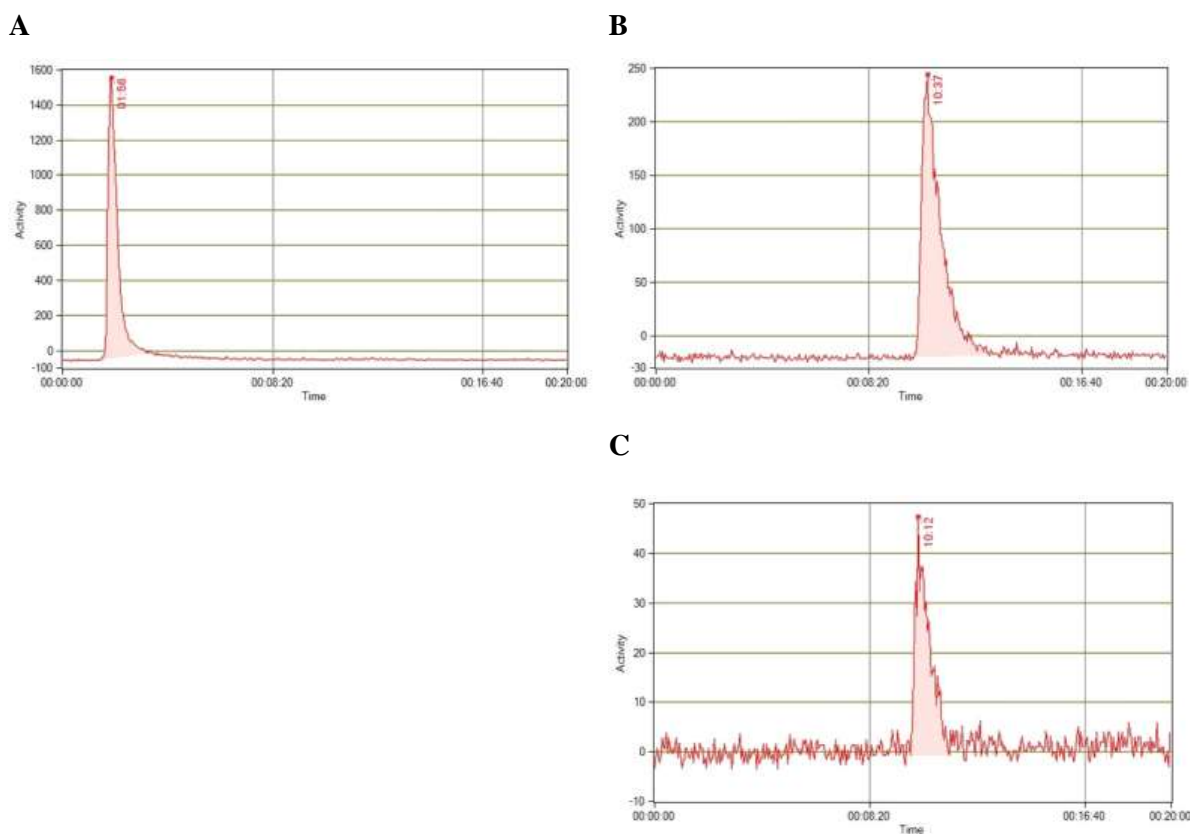
pour le profil d'élution du sérum contrôle (incubation du  $[^{64}\text{Cu}]$ acétate). Ce résultat démontre qu'il n'y a pas de fixation du  $^{64}\text{Cu}$  aux protéines dans le sérum incubé avec le  $[^{64}\text{Cu}]$ TE1PA et que par conséquent aucune décomplexation n'a eu lieu pendant 24 h.

Les chromatogrammes CLHP et CCM (voir figure 29 et 30) obtenus pour le sérum montrent une seule espèce correspondant respectivement au temps de rétention (env. 10 min) et au Rf (0,3) du  $[^{64}\text{Cu}]$ TE1PA, tel que déterminé avec la solution de marquage. Par ailleurs, aucune trace de  $^{64}\text{Cu}$  libre n'a été observée au temps de rétention de 2 min et au Rf de 0,9-1. L'ensemble de ces résultats prouve que le complexe  $[^{64}\text{Cu}]$ TE1PA est parfaitement stable dans le sérum humain, *in vitro*, pendant 24 h, à 4°C comme à 37°C.

A noter que le pourcentage moyen de radioactivité récupéré après déprotéinisation était de seulement 58 %. Ce résultat ne doit pas être interprété comme une fixation du  $^{64}\text{Cu}$  libre sur les protéines mais plutôt comme une adsorption du  $[^{64}\text{Cu}]$ TE1PA dans le culot. En effet, comme décrit précédemment, aucune fixation du  $^{64}\text{Cu}$  sur les protéines sériques n'a été observée en chromatographie d'exclusion stérique avant déprotéinisation.



**Figure 29.** Radiochromatogrammes CCM des solutions de marquage du  $[^{64}\text{Cu}]$ TE1PA (1),  $[^{64}\text{Cu}]$ acetate (2),  $[^{64}\text{Cu}]$ DOTA (3) et du sérum incubé avec le  $[^{64}\text{Cu}]$ TE1PA à 37°C (à 24 h) (4).



**Figure 30.** Chromatogramme CLHP de la solution de  $[^{64}\text{Cu}]$ acétate (A); de la solution de marquage du  $[^{64}\text{Cu}]$ TE1PA (B); du serum incubé avec le  $[^{64}\text{Cu}]$ TE1PA à  $37^\circ\text{C}$  pendant 24 h, après précipitation des protéines (C).

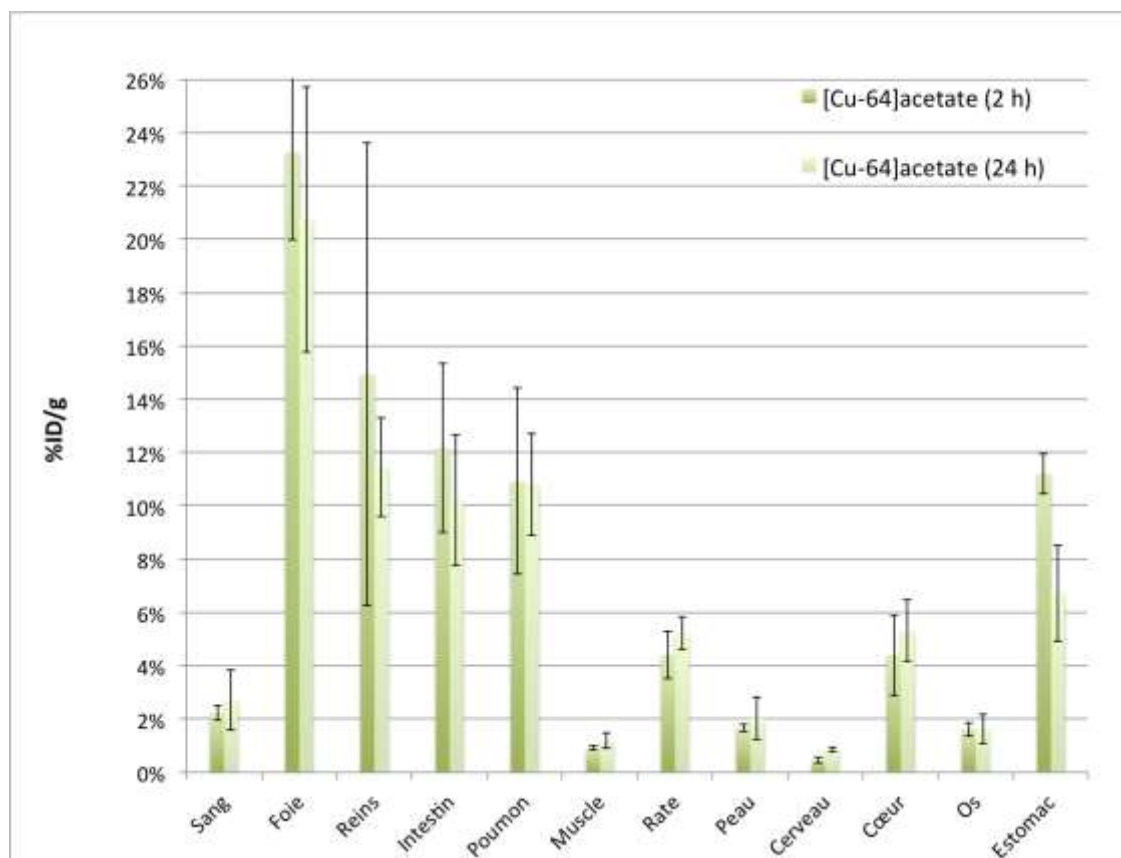
## IV Etudes de stabilité in vivo

### IV.1 Biodistributions et pharmacocinétiques

Après avoir montré l'excellente stabilité du  $[^{64}\text{Cu}]$ TE1PA *in vitro*, son devenir *in vivo* a été évalué par des études de biodistribution et de pharmacocinétique chez la souris BALB/c. Des groupes contrôle de taille identique ont été injectés avec une dose équivalente de  $[^{64}\text{Cu}]$ acétate ou de  $[^{64}\text{Cu}]$ DOTA. L'administration du  $[^{64}\text{Cu}]$ acétate a permis d'obtenir les données de biodistribution et de pharmacocinétique du  $^{64}\text{Cu}$  libre chez la souris BALB/C. Par ailleurs, le  $[^{64}\text{Cu}]$ DOTA a été choisi pour l'autre groupe contrôle puisqu'il s'agit d'un ligand de référence et par ailleurs largement utilisé en pré-clinique comme en clinique.

Les figures 31 et 32 présentent les données de biodistribution à 2h et 24h après injection de 3,3 à 3,6 MBq de  $[^{64}\text{Cu}]$ acétate,  $[^{64}\text{Cu}]$ TE1PA et  $[^{64}\text{Cu}]$ DOTA. Dans le cas du  $[^{64}\text{Cu}]$ acétate, une accumulation de la radioactivité a été observée dans la quasi totalité des organes.

L'accumulation maximale était retrouvée dans le foie ( $23,26 \pm 3,27$  à 2 h et  $20,74 \pm 4,97$  %DI/g à 24 h) alors que pour les reins, les intestins, les poumons, et l'estomac, le %DI/g était supérieur à 10 % à 2 h (respectivement  $14,93 \pm 8,70$  ;  $12,17 \pm 3,16$  ;  $10,92 \pm 3,50$  et  $11,22 \pm 0,76$  %DI/g). Les données obtenues au temps tardif (24 h) ont montré une très faible clairance du  $[^{64}\text{Cu}]$ acétate pour l'ensemble des organes, en comparaison du temps précoce (2 h). Ceci est à relier à la fixation stable du  $^{64}\text{Cu}$  sur les protéines telles que la SOD, la céruloplasmine ou les métallothionéines (cf. II.1 p. 59-62).



**Figure 31.** Biodistribution du  $[^{64}\text{Cu}]$ acétate chez la souris BALB/c à 2h et 24 h après injection de 3,3-3,6 MBq.

En ce qui concerne la biodistribution du  $[^{64}\text{Cu}]$ TE1PA, une très faible accumulation de la radioactivité était retrouvée dans les principaux organes à 2h après injection, sauf dans le foie ( $10,21 \pm 2,04$  %DI/g) et les reins ( $12,39 \pm 0,21$  %DI/g). A titre de comparaison, les valeurs obtenues pour le  $[^{64}\text{Cu}]$ DOTA, au même temps, étaient respectivement de  $2,16 \pm 0,18$  et  $2,84 \pm 0,51$  %DI/g, c'est à dire environ cinq fois moins. Cette différence significative ( $p < 0,003$ ) peut être expliquée par la plus grande lipophilie du ligand HTE1PA ainsi que par la différence de charge globale des complexes. Le  $[^{64}\text{Cu}]$ TE1PA est en effet chargé positivement (+1) alors que le  $[^{64}\text{Cu}]$ DOTA est

chargé négativement (-2), sachant que les complexes de charge globale positive ont tendance à être plus retenus dans le foie et les reins (137).

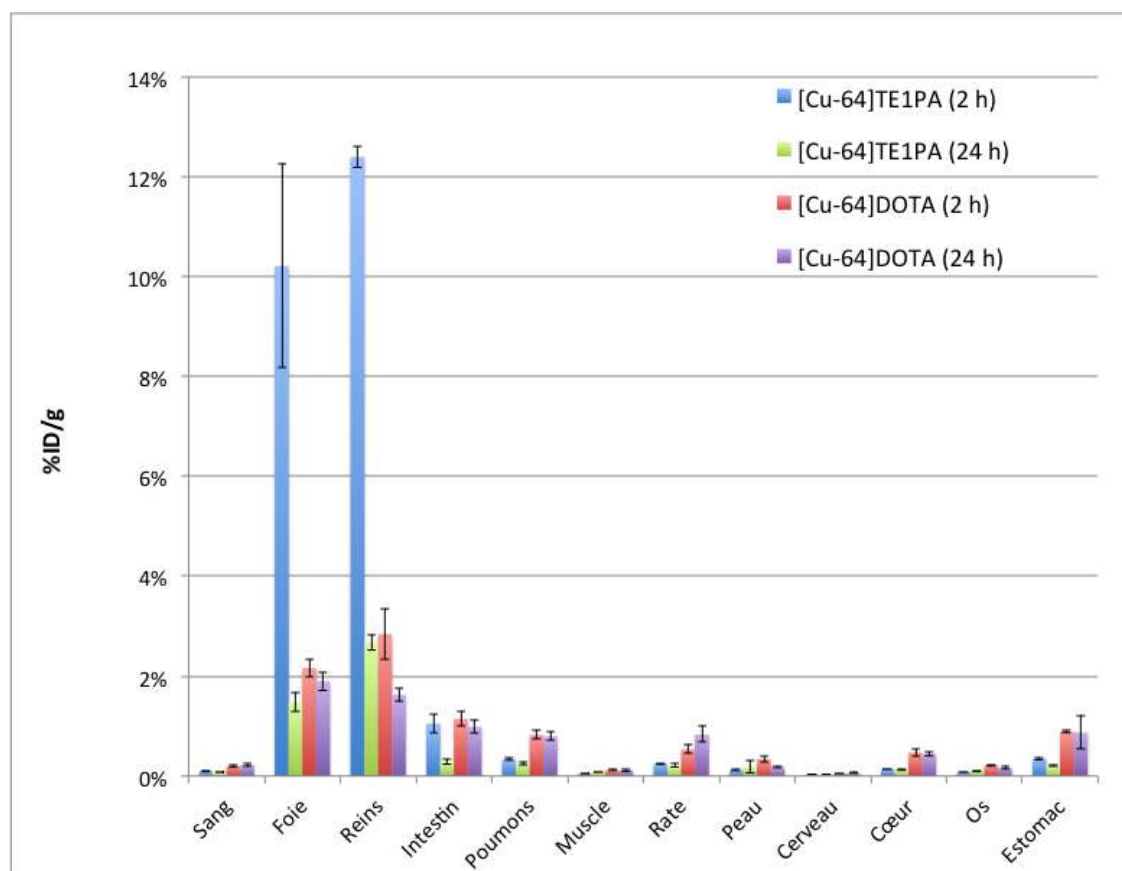


Figure 32. Biodistribution du  $[^{64}\text{Cu}]\text{TE1PA}$  et du  $[^{64}\text{Cu}]\text{DOTA}$  chez la souris BALB/c à 2h et 24 h après injection de 3,3-3,6 MBq.

Les données obtenues à 24 h après injection ont permis de constater que la clairance du  $[^{64}\text{Cu}]\text{TE1PA}$  était très importante entre le temps précoce et le temps tardif. En effet, la radioactivité résiduelle à 24 h était de  $1,47 \pm 0,18$  %DI/g dans le foie et de  $2,68 \pm 0,15$  %DI/g dans les reins, ce qui correspond respectivement à 7 et environ 5 fois moins qu'au temps 2 h ( $p < 0,002$ ).

Concernant le  $[^{64}\text{Cu}]\text{DOTA}$ , la clairance hépatique était nulle ( $p = 0,12$ ) sur le même intervalle de temps et la radioactivité résiduelle était, au final, significativement supérieure comparativement au  $[^{64}\text{Cu}]\text{TE1PA}$  ( $p < 0,02$ ). La clairance dans les reins était très limitée ( $p = 0,006$ ), avec une activité résiduelle correspondant à 57,4 % de l'accumulation à 2h.

Par ailleurs, les données obtenues pour les autres organes d'intérêt, à 24 h, ont montré une accumulation de la radioactivité systématiquement plus faible ( $p < 0,03$  ; avec un test unilatéral) pour le  $[^{64}\text{Cu}]\text{TE1PA}$  par rapport au  $[^{64}\text{Cu}]\text{DOTA}$ . Ceci témoigne d'une transchéliation plus

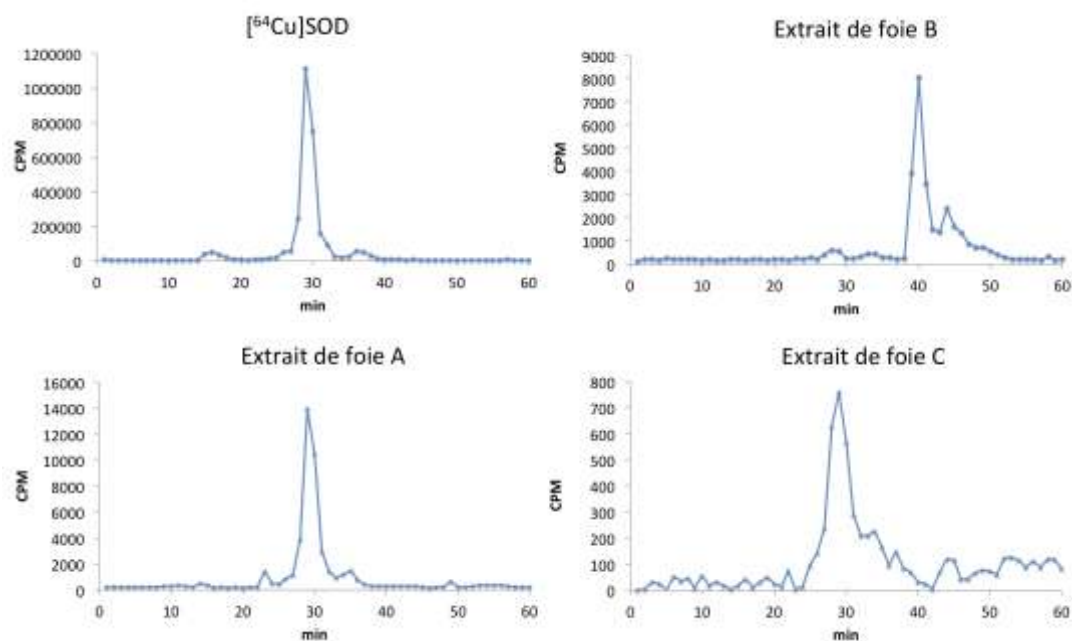
importante dans le cas du [<sup>64</sup>Cu]DOTA. A noter que celle-ci n'a pas nécessairement lieu au niveau de ces organes mais plus vraisemblablement au niveau hépatique où le cuivre est incorporé à la céruloplasmine, cette-dernière étant ensuite exportée dans la circulation sanguine puis captée par les organes périphériques (cf. III.3 p. 63-64). On constate d'ailleurs que l'activité résiduelle sanguine à 24 h était significativement plus grande ( $p=0,0008$  ; avec un test unilatéral) pour le [<sup>64</sup>Cu]DOTA comparativement au [<sup>64</sup>Cu]TE1PA ( $0,22\pm 0,038$  %DI/g et  $0,077\pm 0,002$  %DI/g respectivement).

La demi-vie d'élimination calculée était de 21 min pour le [<sup>64</sup>Cu]TE1PA et de 16 min pour le [<sup>64</sup>Cu]DOTA. Le volume de distribution à l'équilibre était de 185 et 140 mL respectivement, ce qui corrobore le fait que le [<sup>64</sup>Cu]TE1PA s'accumule initialement de façon plus importante. La séparation des fèces et des urines via la cage à métabolisme a montré que le [<sup>64</sup>Cu]TE1PA était éliminé à plus de 80 % dans les urines alors que pour le groupe contrôle le [<sup>64</sup>Cu]acétate était éliminé à 95 % dans les fèces.

## IV.2 *Métabolisme*

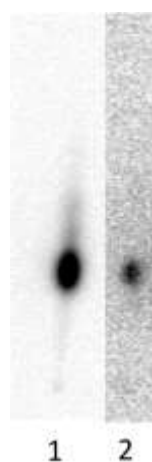
L'étude de métabolisme a permis d'évaluer la masse moléculaire des espèces radiomarquées s'étant accumulées dans le foie. Elle a été réalisée sur les animaux sacrifiés à 2 h après injection, c'est à dire au temps où les différences de biodistributions étaient les plus importantes entre le [<sup>64</sup>Cu]TE1PA et le [<sup>64</sup>Cu]DOTA. L'analyse à blanc, réalisée sur le foie d'une souris non injectée mais supplémenté avec du [<sup>64</sup>Cu]TE1PA avant homogénéisation, a permis de s'assurer que le protocole d'extraction n'induisait pas en tout ou partie la dissociation du complexe.

Le profil chromatographique des extraits de foie des souris injectées avec le [<sup>64</sup>Cu]acétate présentait trois espèces protéiques majoritaires ayant fixé le cuivre-64 (voir figure 33). Ce profil est en accord avec celui obtenu dans l'étude menée par Bass et al (135). La fraction éluée à 29 min correspondait exactement au pic principal observé sur le profil de la SOD bovine radiomarquée au <sup>64</sup>Cu (32,6 kDa). Les fractions éluées à 23 et 35 min correspondent respectivement à des masses moléculaires de 130 à 150 kDa et 10 kDa, et peuvent être associées à la céruloplasmine et aux métallothionéines.



*Figure 33. Chromatogrammes CLHP (exclusion stérique) de la solution de  $[^{64}\text{Cu}]\text{SOD}$  et des extraits de foie des souris injectées avec 3,3-3,6 MBq de  $[^{64}\text{Cu}]\text{acetate}$  (A),  $[^{64}\text{Cu}]\text{TE1PA}$  (B) ou  $[^{64}\text{Cu}]\text{DOTA}$  (C) et sacrifiées à 2 h après injection.*

Pour les animaux injectés avec le  $[^{64}\text{Cu}]\text{TE1PA}$ , l'analyse par chromatographie d'exclusion a montré que plus de 90 % de la radioactivité éluée correspondait à des espèces dont la masse moléculaire est inférieure à 2 kDa. Seulement 8 % de la radioactivité éluée (fractions 21 à 26 min) était attribuable à des protéines radiomarquées. L'analyse CCM a permis de démontrer que l'extrait hépatique ne contenait qu'une seule espèce radiomarquée, à savoir le  $[^{64}\text{Cu}]\text{TE1PA}$  sous sa forme intacte, puisque migrant au Rf de 0,3 (voir figure 34).



*Figure 34. Radiochromatogrammes CCM de la solution de marquage du  $[^{64}\text{Cu}]\text{TE1PA}$  (1) et de l'extrait de foie (à 2 h après injection) d'une souris injectée avec 3,3-3,6 MBq de  $[^{64}\text{Cu}]\text{TE1PA}$  (2).*



Concernant le groupe d'animaux injectés avec le  $[^{64}\text{Cu}]\text{DOTA}$ , l'étude de métabolisme a révélé, majoritairement, la présence de  $[^{64}\text{Cu}]\text{SOD}$ . A noter que le profil est particulièrement bruité, ce qui s'explique d'une part parce que l'analyse CLHP a été réalisée 12 h après l'extraction, pour des raisons organisationnelles. D'autre part, l'activité récupérée dans le surnageant, après centrifugation, ne représentait que  $45,02 \pm 4,21\%$  de l'activité totale de l'homogénat. A titre de comparaison, les rendements d'extractions étaient respectivement de  $77,18 \pm 5,18\%$  et  $46,34 \pm 5,60\%$  en ce qui concerne les animaux injectés avec le  $[^{64}\text{Cu}]\text{TE1PA}$  et le  $[^{64}\text{Cu}]\text{acétate}$ . Une hypothèse permettant d'expliquer cette différence de rendement d'extraction entre les groupes  $[^{64}\text{Cu}]\text{TE1PA}$  d'une part et  $[^{64}\text{Cu}]\text{DOTA}$  et  $[^{64}\text{Cu}]\text{acétate}$  d'autre part, est qu'il se forme des agrégats de protéines durant l'homogénéisation. Ces agrégats vont sédimenter et se retrouver dans le culot lors de l'étape de centrifugation. Dans le cas du  $[^{64}\text{Cu}]\text{TE1PA}$ , le pourcentage d'extraction plus important traduirait ainsi le fait que la fixation du cuivre-64 aux protéines est très limitée.

Au final, l'étude de métabolisme a permis de confirmer que l'accumulation de la radioactivité dans le foie chez les souris injectées avec le  $[^{64}\text{Cu}]\text{TE1PA}$ , à 2h après l'injection, est liée aux propriétés intrinsèques du complexe, à savoir sa lipophilie et sa charge globale positive, et non à des phénomènes de transchélation.

## Discussion

---

La N-alkylation des macrocycles polyazotés par un bras picolinate a récemment été proposée comme alternative aux fonctions carboxylates ou phosphonates pour les ligands du cuivre (186,187). Lima et al. ont montré, dans une étude de la complexation avec le cuivre froid, que le ligand HTE1PA, dérivé du cyclam, remplissait la plupart des exigences d'un bon chélateur du cuivre (186). Partant de ce constat, notre travail a consisté à étudier le radiomarquage d'HTE1PA avec le cuivre-64 puis d'évaluer la stabilité du complexe  $[^{64}\text{Cu}]\text{TE1PA}$ , *in vitro* et *in vivo*, en comparaison du  $[^{64}\text{Cu}]\text{acétate}$  et du  $[^{64}\text{Cu}]\text{DOTA}$  (une référence très usitée). Comme le suggéraient les résultats obtenus pour la complexation du cuivre froid (186), nous avons constaté une complexation rapide du cuivre-64 par HTE1PA assortie d'un rendement quantitatif à température ambiante. Concernant le DOTA, celui-ci nécessite l'utilisation d'un excès de ligand (30 mM) ainsi qu'un temps réactionnel d'au minimum 45 min pour obtenir un rendement de 95 % à la même température (137). Pour pallier cette limitation, dans le cadre de nos expériences, le radiomarquage du DOTA a été réalisé en chauffant à 80°C pendant 30 min afin de garantir un rendement de radiomarquage équivalent à celui obtenu pour l'HTE1PA. En plus de complexer rapidement le cuivre-64, les essais d'optimisation ont montré que l'HTE1PA pouvait être radiomarké avec un rendement quasi quantitatif en mettant en jeu de très faibles quantités de ligand : un essai de radiomarquage avec une solution à 10 micromolaires d'HTE1PA a permis d'obtenir 95 % de rendement alors que dans ces conditions le ratio ligands/métaux totaux était inférieur à 1. Ceci démontre la sélectivité très importante de l'HTE1PA pour le cuivre. A notre connaissance une telle sélectivité n'a jusqu'à présent été décrite que pour les dérivés sarcophagines (188). Cette propriété est particulièrement intéressante pour le radiomarquage d'anticorps puisqu'elle permet de maximiser l'activité spécifique malgré la présence de métaux contaminants, qui sont introduits en concentration variable, d'une production à l'autre, par la solution de cuivre-64.

L'étude de la stabilité *in vitro* du  $[^{64}\text{Cu}]\text{TE1PA}$  n'a montré aucune décomplexation dans le sérum humain à 37°C, sur 24 h. Ce résultat était attendu en raison de l'importante inertie cinétique observée pour le complexe de cuivre froid  $[^{63/65}\text{Cu}]\text{TE1PA}$  (186). Par ailleurs, les données de la littérature relatent une stabilité sérique identique pour le complexe de référence, le  $[^{64}\text{Cu}]\text{DOTA}$ , malgré sa plus faible inertie cinétique (189).

L'étude de la biodistribution du  $[^{64}\text{Cu}]\text{TE1PA}$  a montré une accumulation relativement importante de la radioactivité dans le foie et les reins au temps de biodistribution précoce (2 h). Une telle distribution n'est pas nécessairement le signe d'une instabilité *in vivo* et peut être

associée aux propriétés physico-chimiques du complexe. Premièrement, même si le coefficient de distribution du complexe n'a pas été mesuré, il est presque certain que le bras picolinate confère une plus grande lipophilie au complexe  $[^{64}\text{Cu}]\text{TE1PA}$ , comparativement aux complexes formés par des ligands fonctionnalisés par des carboxylates (ou des phosphonates) au niveau de leurs atomes d'azote, comme c'est le cas du DOTA. Cette plus grande lipophilie se traduit in vivo par une élimination partielle du  $[^{64}\text{Cu}]\text{TE1PA}$  par la voie hépatique - 20 % de la radioactivité éliminée par voie fécale - d'où une accumulation plus importante dans le foie à 2 h du  $[^{64}\text{Cu}]\text{TE1PA}$  par rapport au  $[^{64}\text{Cu}]\text{DOTA}$ . Deuxièmement, il faut prendre en considération la charge globale positive du  $[^{64}\text{Cu}]\text{TE1PA}$ . Celle-ci joue en effet un rôle majeur dans le tropisme du complexe et sa vitesse d'élimination in vivo, et il a été démontré qu'une charge positive conduisait à une accumulation significativement plus importante dans les organes d'éliminations (foie et reins), comme c'est le cas - au niveau rénal - de certains dérivés sarcophagines (179), par rapport aux complexes neutres ou chargés négativement, comme le  $[^{64}\text{Cu}]\text{DOTA}$  par exemple (137).

L'élimination d'un complexe de cuivre-64 par la voie hépatique n'est pas une situation des plus favorables, notamment parce que le ligand est en compétition - pour la complexation du  $^{64}\text{Cu}^{2+}$  - avec des quantités très importantes de cuproprotéines au niveau du foie. De ce fait, une élimination rénale rapide du complexe est considérée comme préférable car elle permet de minimiser le passage hépatique, qui est associé à une forte probabilité de transchéliation du cuivre-64 vers les cuproprotéines. Ce type de profil d'élimination est observé pour le  $[^{64}\text{Cu}]\text{DOTA}$ . Nous avons en effet observé une accumulation hépatique relativement faible du  $[^{64}\text{Cu}]\text{DOTA}$  à 2 h après injection. En revanche, la clairance de ce même organe était nulle entre le temps précoce et tardif. Nous notons également que l'accumulation du  $[^{64}\text{Cu}]\text{DOTA}$  à 2 h dans le foie et les reins était significativement plus importante dans nos conditions expérimentales que dans une précédente étude réalisée avec le même modèle animal (190) : respectivement 1,7 et 2,2 fois plus. Ces différences peuvent avoir pour origine l'activité spécifique du complexe injecté, de même que les variabilités au sein du modèle animal (poids des animaux, âge, nombre d'animaux par groupe).

En ce qui concerne le  $[^{64}\text{Cu}]\text{TE1PA}$ , la biodistribution à 24 h a mis en évidence que, malgré son accumulation relativement importante à 2 h dans le foie et les reins, sa clairance était nettement supérieure à celle du  $[^{64}\text{Cu}]\text{DOTA}$  sur le même intervalle de temps. Des résultats similaires ont été décrits pour le CB-TEAMA, un dérivé du CB-TE2A - connu pour son exceptionnelle inertie in vivo (159,169,171,191) - dont l'amidification d'une des fonctions coordinantes carboxylates a conduit à une augmentation de la lipophilie, assortie d'une augmentation de l'accumulation dans le foie et les reins à 30 min après injection (respectivement 7,4 et 2 fois plus) ainsi qu'à une clairance hépatique et rénale importante entre le temps 30 min et 24 h (respectivement 93,3 %

et plus de 90 %) (173). Ces résultats démontrent qu'une accumulation initiale dans le foie n'est pas corrélée à une mauvaise stabilité *in vivo*, à condition que le complexe soit très résistant à la transchélation. Pour le [<sup>64</sup>Cu]TE1PA, une telle propriété a pu être confirmée par l'étude de métabolisme : à 2 h, plus de 90 % de l'accumulation dans le foie a pu être identifiée comme correspondant à la forme intacte du complexe injecté, alors que dans le cas du [<sup>64</sup>Cu]DOTA la quasi totalité de la radioactivité était associée aux métalloprotéines, en particulier à la SOD.

La résistance à la transchélation est un des points clé de la stabilité des complexes de cuivre-64 *in vivo* et notamment dans le cadre des applications d'imagerie phénotypique. De fait, la seule prise en compte de l'élimination du complexe n'est pas représentative du système rencontré en imagerie phénotypique. Cette dernière implique la conjugaison du complexe à une macromolécule de haut poids moléculaire qui va imposer sa propre pharmacocinétique. Dans le cas d'un anticorps entier, la distribution est ainsi de l'ordre de 2 à 4 jours (30). Cette augmentation du temps de résidence induit pour le complexe un nombre de passages hépatiques démultipliés. Dans ces conditions, un complexe ayant une mauvaise résistance à la transchélation, en particulier envers les métalloprotéines hépatiques, va progressivement engendrer une accumulation non spécifique du cuivre-64 dans le foie. Celle-ci aura pour conséquence une diminution du contraste des images scintigraphiques et conduira à des difficultés d'interprétation dans le voisinage du foie. A l'opposé, la résistance à la transchélation observée pour le [<sup>64</sup>Cu]TE1PA offre des perspectives encourageantes quant à la stabilité *in vivo* d'anticorps radiomarqués au cuivre-64 par le biais du TE1PA. La suite logique de ce travail va donc consister à introduire une fonction de couplage sur la structure de l'HTE1PA dans le but de vérifier l'hypothèse précédemment avancée et de faire la preuve de concept de l'utilisation de l'HTE1PA, et plus généralement des ligands macrocycliques fonctionnalisés avec une ou plusieurs fonctions picolines, pour le radiomarquage indirect d'anticorps au cuivre-64 dans le cadre de l'imagerie phénotypique.

## Conclusion

---

Le DOTA ainsi que les dérivés du DOTA sont les ligands les plus couramment utilisés pour radiomarquer des macromolécules d'intérêt biologique avec le cuivre-64. Il est cependant bien établi que ces ligands ne remplissent pas l'ensemble des exigences et spécifications pour une utilisation en médecine nucléaire, notamment en ce qui concerne la stabilité *in vivo* des complexes formés. Si les ligands macrobicycliques tels que le CB-TE2A et les dérivés sarcophagines sont des alternatives intéressantes au DOTA, ils présentent néanmoins certains inconvénients (192) justifiant la poursuite des recherches dans la conception, la synthèse et l'évaluation de nouveaux ligands.

C'est dans ce contexte que la N-fonctionnalisation du cyclam par un bras picolinate a été envisagée puis obtenue par 2 voies de synthèse différentes avec des rendements importants. Parmi ces 2 voies, celle basée sur la protection diformyle du cyclam devra être privilégiée pour de futures applications pharmaceutiques. En effet, la deuxième voie - impliquant une triprotection phosphoryle du cyclam - nécessite l'utilisation de tetrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>), un solvant de classe I selon la classification de la pharmacopée européenne, qui doit être proscrit dans la fabrication de substances actives, d'excipients et de médicaments en raison de sa toxicité et de son impact environnemental.

Le ligand cyclam monopicolinate, nommé HTE1PA, a déjà montré des propriétés intéressantes pour la complexation du cuivre froid (186). Nous avons pu confirmer dans ce travail qu'il est également un très bon ligand du cuivre-64 dans des conditions de marquage sans entraîneur. L'étude de la biodistribution du [<sup>64</sup>Cu]TE1PA *in vivo* a par ailleurs montré que le complexe était particulièrement résistant à la transchelation. La N-fonctionnalisation monopicolinate apparaît donc comme une alternative de choix, notamment au pontage du macrocyclique, pour accroître l'inertie cinétique des complexes de cuivre formés par des ligands dérivés du cyclam. Sur la base de ces observations, l'HTE1PA doit être greffé à un vecteur pour prouver l'intérêt des dérivés picolinate dans des applications d'imagerie phénotypiques ou de RIT. Plusieurs stratégies peuvent être envisagées : i) la N-fonctionnalisation via une des trois amines secondaires du macrocycle, ii) la C-fonctionnalisation, soit sur un atome de carbone du macrocycle, soit au niveau du cycle aromatique, iii) une simple réaction de couplage *in situ* faisant réagir le carboxylate du bras picolinate et une amine primaire du vecteur.

# CONCLUSION GENERALE

Le radiomarquage de vecteurs ayant la capacité de reconnaître spécifiquement une cible antigénique est à la base du développement de l'imagerie phénotypique-TEP. Parmi les radionucléides émetteurs de positons pouvant être utilisés, le cuivre-64 est un des meilleurs compromis. Ses propriétés chimiques nécessitent de mettre en œuvre un radiomarquage indirect en utilisant un ligand bifonctionnel permettant d'une part la complexation du cuivre sous sa forme  $^{64}\text{Cu}(\text{II})$  et d'autre part son ancrage au vecteur. Les ligands développés jusqu'à présent pour l'imagerie phénotypique-TEP ne sont pas suffisamment stables *in vivo* si bien que les radiopharmaceutiques marqués au cuivre-64 peuvent difficilement être indiqués pour des examens de médecine nucléaire en routine.

Le travail réalisé s'inscrit dans le cadre du développement d'un nouveau ligand, le cyclam monopicolinate (TE1PA), avec pour objectif d'améliorer la stabilité des marquages au cuivre-64 *in vivo*. Nous avons montré que le radiomarquage du TE1PA avec le cuivre-64 est rapide et quantitatif à température ambiante et par conséquent qu'il est à même d'être utilisé pour radiomarquer l'ensemble des vecteurs existants, y compris les anticorps entiers. D'autre part, nous avons mis en évidence que le complexe  $[^{64}\text{Cu}]\text{TE1PA}$  était particulièrement stable *in vitro* et *in vivo*, et en particulier qu'il était résistant à la transchélation au niveau hépatique. Ces résultats sont très encourageants pour de futures applications puisqu'ils promettent l'obtention d'images phénotypiques ayant un contraste élevé et un impact dosimétrique moins défavorable de l'examen.

La suite de ce travail va consister à fonctionnaliser le TE1PA pour permettre le couplage à un vecteur puis à faire la preuve de concept de son utilisation en imagerie phénotypique-TEP. Le ligand sera dans un premier temps couplé à un anticorps entier murin (9E7) ciblant l'antigène CD138 exprimé par les cellules myélomateuses. Après le radiomarquage de l'immunoconjugué au cuivre-64 - dans les conditions définies dans ce travail - la preuve de concept sera réalisée sur un modèle murin de myélome multiple : Souris Skid injectée avec des cellules myélomateuses de la lignée 5T33 (193) ou 5T2MM (194). Dans un deuxième temps, le radiomarquage de fragments d'anticorps pourra être envisagé afin d'améliorer la cinétique du ciblage. Enfin, un volet thérapeutique avec du cuivre-67 serait une suite logique à ces travaux afin de développer une approche théranostique de la prise en charge du myélome multiple.

# Annexes

## **Annexe 1 : Article soumis au « Journal of nuclear medicine & biology » en octobre 2013 (NUCMEDBIO-D-13-00276)**

---

### **Radiolabeling of HTE1PA: a new monocolinate cyclam derivative for Cu-64 phenotypic imaging. In vitro and in vivo stability studies in mice.**

Mathieu Frindel<sup>1</sup>, Nathalie Camus<sup>2</sup>, Aurore Rauscher<sup>1</sup>, Mickaël Bourgeois<sup>1,3</sup>, Cyrille Alliot<sup>1,3</sup>, Louisa Barré<sup>4</sup>, Jean-François Gestin<sup>1</sup>, Raphaël Tripier<sup>2,\*</sup>, Alain Faivre-Chauvet<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> *Centre de Recherches en Cancérologie Nantes-Angers (CRCNA), Unité INSERM 892 - CNRS 6299, 8 quai Moncousu, BP 70721 44007 Nantes Cedex, France*

<sup>2</sup> *Université de Bretagne Occidentale, UMR-CNRS 6521, SFR ScInBioS, UFR des Sciences et Techniques, 6 avenue Victor le Gorgeu, C.S. 93837, 29238 Brest Cedex 3, France*

<sup>3</sup> *Cyclotron ARRONAX, 1 rue Aronnax CS 10112 44817 Saint-Herblain Cedex, France*

<sup>4</sup> *CEA-DSV-I2BM-ISTCT-Laboratoire de Développements Méthodologiques en TEP (LDM TEP), UMR 6301, Cyceron-Bd Henri Becquerel, BP 5229, 14074 Caen Cedex 5, France*

#### **\* Corresponding authors:**

Alain Faivre-Chauvet, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes (IRS UN), CRCNA - UMR\_S 892 – C 6299, 8 quai Moncousu, BP 70721 44007 Nantes Cedex, France. Tel.: +33 (0)2 28080219; fax: +33 (0)2 28080204; E-mail address: [Alain.Faivre-Chauvet@univ-nantes.fr](mailto:Alain.Faivre-Chauvet@univ-nantes.fr)

Raphaël Tripier, Université de Bretagne Occidentale, UMR-CNRS 6521, SFR ScInBioS, UFR des Sciences et Techniques, 6 avenue Victor le Gorgeu, C.S. 93837, 29238 Brest Cedex 3, France. Tel.: +33 (0)2 98016138; fax: +33 (0)2 98017001; E-mail address: [Raphael.Tripier@univ-brest.fr](mailto:Raphael.Tripier@univ-brest.fr)

**Abbreviated title:** In vitro/vivo stability study of [<sup>64</sup>Cu]TE1PA

**Key words:** Copper radioisotopes, Chelating agents, Metabolism, Radiopharmaceuticals, DOTA, Cyclam.

## ABSTRACT

**Introduction:** HTE1PA is a monocolinate-*N*-alkylated cyclam-based ligand which has previously demonstrated a fast complexation process, a high kinetic inertness and important thermodynamic and electrochemical stability with respect to natural copper. In this work we first developed a new synthetic route to obtain HTE1PA in good yields. Then, we investigated HTE1PA complexation properties towards copper-64 and assessed the *in vitro* and *in vivo* stability of its radiolabelled complex.

**Methods:** Radiolabeling of HTE1PA with copper-64 was tested at different ligand concentrations in ammonium acetate medium. The *in vitro* stability study was carried out by incubating the [<sup>64</sup>Cu]TE1PA complex in human serum at both 37°C and 4°C; chromatographic controls were performed over 24 h. Biodistribution, pharmacokinetic and hepatic metabolism of [<sup>64</sup>Cu]TE1PA were conducted in BALB/c mice in comparison with [<sup>64</sup>Cu]acetate and [<sup>64</sup>Cu]DOTA, as a reference ligand.

**Results:** The promising results obtained for natural copper complexation are confirmed. HTE1PA was quantitatively radiolabeled in 15 min at room temperature. The resulting complex showed a high serum stability. *In vivo*, [<sup>64</sup>Cu]TE1PA induce a significant uptake in the liver and kidneys at the early biodistribution time. Nevertheless, a high speed wash out was observed and led to a significantly lower uptake in the liver than for [<sup>64</sup>Cu]DOTA at 24 h. The metabolism study was consistent with a high resistance to transchelation as the initial uptake in liver matches the intact form of the [<sup>64</sup>Cu]TE1PA.

**Conclusion:** Despite the partial elimination of HTE1PA - as a copper-64 complex - through the hepatic route, its high selectivity for copper and resistance to transchelation make it a promising ligand for antibody radiolabeling with either copper 64 or copper-67.

### 1. Introduction

Phenotypic imaging study prior to beta radioimmunotherapy (RIT) is a required step to calculate the dosimetry and to predict RIT efficacy. The availability of a radionuclide pair of beta+/beta- isotopes is the optimal solution. It allows an accurate modeling of the radiolabelled immunoconjugate biodistribution and a good image resolution through PET-CT acquisition. Thereby, <sup>64/67</sup>Cu isotopes pair is among the most awaited.

The use of <sup>64</sup>Cu- and <sup>67</sup>Cu-based radiopharmaceuticals especially needs the design of chelators allowing the good complexation of copper ions and that fulfill important requirements, as a fast kinetic process of chelation, a high thermodynamic stability and notably an important inertness in drastic conditions including reducing medium [1,2]. Different non-macrocyclic chelators for Cu<sup>2+</sup> radioisotopes have been reported in the literature [3-5], and, among the potential chelators used for complexation of Cu<sup>2+</sup>, azamacrocycles continue to attract the interest of nuclear community. Indeed, if tri and tetraaza macrocycles are well known to form highly stable complexes, for instance with Gd<sup>3+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> ions (MRI contrast agents) [6-8], <sup>68</sup>Ga, <sup>111</sup>In, <sup>99m</sup>Tc (PET / SPECT) [9], <sup>213</sup>Bi, <sup>149</sup>Tb, <sup>225</sup>Ac, <sup>212</sup>Bi, <sup>212</sup>Pb, <sup>90</sup>Y, <sup>153</sup>Sm (RIT) [10], they are also very investigated especially for <sup>64</sup>Cu and <sup>67</sup>Cu complexation owing to their ability to form complexes with very high thermodynamic, kinetic and electrochemical stability with respect to metal dissociation [11]. "DOTA and TETA-like" macrocycles bearing various coordinative pendant arms are of particular interest, as their properties and selectivity for some metal ions may be rather different from those of their acetate functionalized parents.

Tetraazacycloalkane derivatives such as H<sub>4</sub>DOTA, H<sub>4</sub>TETA and H<sub>2</sub>TE2A (Figure 1) have been commonly used as copper chelators for the radiolabeling of biomolecules with either <sup>64</sup>Cu or <sup>67</sup>Cu in pre-clinical studies or clinical trials [12]. In fact, these ligands are commercially available, have a fast complexation kinetics and their complexes have a good thermodynamic stability [13].

However, these complexes are not sufficiently inert in acid or reducing conditions, resulting in the decomplexation of copper as <sup>64/67</sup>Cu<sup>2+</sup> or <sup>64/67</sup>Cu<sup>+1</sup> respectively. This lack of inertness is critical for the stability of the complex *in vivo*, where such environments are encountered. Moreover, the competition between the ligand and some copper complexing proteins may result in the transchelation of the copper-64/67 *in vivo*. These proteins, namely ceruloplasmin, metallothioneins and SOD are particularly present in the liver where the copper physiological metabolism takes place. SOD has been identified as the most competitive [14].

Fig. 1



Thus, an uptake of radioactive copper in the liver with a long retention time is consistently observed for in vivo studies involving either injection of copper-64/67 complex or injection of radiolabelled antibodies or peptides using a bifunctional derivative of DOTA or TETA-like ligands. Other organs such as kidneys or spleen and the blood are affected by this radioactivity uptake combined with a slow clearance, which represents a serious limitation for medical imaging and therapeutic applications owing to a bad image contrast and to undesirable irradiation of normal organs [15-17].

In order to address this issue, cross-bridged derivatives, e.g. H<sub>2</sub>CB-TE2A, and hexa-aza cage Sar (3,6,10,13,16,19-hexaazabicyclo[6.6.6] icosane) derivatives, e.g. AmBaSar, were designed and studied as copper chelators. These ligands have shown to form extremely inert complexes with Cu<sup>2+</sup>, associated with improvements in the in vivo stability of their copper-64 complexes as compared to mono-macrocyclic ligands [18-20]. Nevertheless, such ligands still have drawbacks for radiopharmaceutical applications: H<sub>2</sub>CB-TE2A constrained structure lead to dramatic slow complexation kinetics and Sar derivative have shown a low electrochemical stability [21].

Therefore, the current challenge is to find new ligands able to combine better all the required properties. With this in mind, we recently presented the syntheses and the complexation behavior towards Cu<sup>2+</sup> of the HTE1PA macrocyclic ligand, which consists in a mono-*N*-functionalized cyclam by a picolinate pendant and coordinating arm (Figure 2). Our results revealed that the cyclam-based ligand HTE1PA was a very attractive receptor for copper(II). [22] Firstly, the introduction of the picolinate group did not influence significantly the basicity of the nitrogen atoms of the macrocycle compared to cyclam, but the presence of carboxylic function increased the complexation properties of the chelator framework. The process of complexation of Cu<sup>2+</sup> with HTE1PA was found to be very fast, including in acid medium. Besides, the thermodynamic stability of the complex of Cu<sup>2+</sup> was found to be very high, with an important selectivity for this metal ion over Zn<sup>2+</sup> (p[Cu<sup>2+</sup>] = 18.64 vs p[Zn<sup>2+</sup>] = 12). A detailed investigation of the structure of the Cu<sup>2+</sup> complexes by using X-ray crystallography, EPR and UV-vis spectroscopies revealed that the ligand binds to the metal ion by using its five nitrogen donor and that the complex geometry does not change whatever the protonated or unprotonated form of the carbonyl function. The investigation of the kinetic stability in acidic solutions underlined a significantly higher kinetic inertness of the [CuTE1PA]<sup>+</sup> complex compared to other copper(II) complexes of macrocyclic ligands reported in the literature. In addition, electrochemical experiments emphasized a good stability of the complex with respect to metal ion dissociation upon reduction of the metal ion to Cu<sup>+</sup> at about neutral pH.

Consequently, HTE1PA appears to be a very attractive candidate for the development of Cu<sup>2+</sup>-based radiopharmaceuticals, for application in PET imaging or RIT, justifying its study with copper-64 and copper-67 respectively. Therefore, after the description of a new synthetic methodology to obtain HTE1PA in good yields we investigated the complexation of copper-64 with HTE1PA and assessed the in vitro and in vivo properties of its radiolabelled complex. Results are presented then discussed in relation to the preliminary study done with natural copper.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 General

The reagents used for the synthesis were purchased from ACROS Organics and from Aldrich Chemical Co. Cyclam formyl (**2a**) [23], 6-chloromethyl-pyridine-2-carboxylic acid methyl ester (**3**) [24], and phosphoryl cyclam (**2b**) [25] were synthesized as previously described. Elemental analyses were performed at the Service de Microanalyse, CNRS, 69360 Solaize, France. NMR and MALDI mass spectra were recorded at the "Services communs" of the University of Brest. <sup>1</sup>H, <sup>31</sup>P, and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded with Bruker Avance 500 (500 MHz), Bruker Avance 400 (400 MHz), or Bruker AMX-3 300 (300 MHz) spectrometers. MALDI mass spectra were recorded with an Autoflex MALDI TOF III LRF200 CID spectrometer.

### 2.2 Organic Synthesis

#### 2.2.1. Synthesis of HTE1PA·4HCl Compound via compound **4a**.

6-chloromethyl-pyridine-2-carboxylic acid methyl ester (2.48 g, 13.34 mmol) is added to a solution of cyclam formyl **2a** 1 g, 4.46 mmol) and sodium iodide (4 g, 26.71 mmol) in 40 mL of distilled acetonitrile. The mixture was stirred 3 days at 60°C. The pink precipitate formed was then filtered,

Fig. 2

washed with acetonitrile and dried over vacuum. This mixture, containing NaCl, NaI and **4a** was only analysed by  $^{13}\text{C}$  NMR.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 75.5 MHz): 20.6; 25.4; 45.2; 51.0; 51.5; 51.8; 52.1; 52.7; 52.8; 53.8; 58.1; 64.1; 76.1; 86.4; 122.8; 127.6; 138.3; 147.9; 158.9; 167.6. HR-MS (ESI+):  $m/z$  374.26; calcd. for  $[\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_2]^+$  374.26.

The powder containing **4a** was dissolved in NaOH 4M and stirred during 4 hours. The solution was extracted with  $\text{CHCl}_3$  (3×50 mL) and dried on  $\text{MgSO}_4$ . The organic layers were collected and after evaporation of solvent, hydrochloric acid (30 mL, 4 M) was slowly added to the colourless oil, and the mixture was stirred and heated at 80 °C overnight. After cooling to room temperature and solvent evaporation the residue was dissolved in the minimum amount of water/ethanol and evaporated. This was repeated three times to avoid the presence of residual hydrochloric acid. This gives the expected compound as the hydrochloride salt with an overall yield of 58% (1.24 g, 2.59 mmol).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz): 1.95–2.12 (m, 2H) ; 2.20–2.37 (m, 2H) ; 3.00–3.11 (m, 2H); 3.12–3.25 (m, 4H); 3.27–3.62 (m, 10H); 4.18 (s, 2H); 7.78 (d, 1H,  $^3\text{J} = 7.7$  Hz); 8.17 (dd, 1H,  $^3\text{J}=7.5\text{Hz}$ ,  $^3\text{J}=7.6\text{Hz}$ ); 8.22(d, 1H,  $^3\text{J}=7.6\text{Hz}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 75.5 MHz): 23.4; 24.7; 41.8; 43.7; 45.1; 45.7; 46.0 (2C); 52.0; 55.0; 60.0; 128.0; 130.6; 144.0; 149.5; 158.9; 169.6. Elem. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_2 \cdot 4\text{HCl} \cdot \text{EtOH}$ : C, 43.27; H, 7.45; N, 13.28. Found: C, 43.10; H, 7.06; N, 13.24. HR-MS (ESI+):  $m/z$  336.2380; calcd. for  $[\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_2]^+$  336.2394.

2.2.2. Compound **4b**. Phosphoryl cyclam **2b** (1.037 g, 4.244 mmol) was dissolved in 20 mL of dry  $\text{CH}_3\text{CN}$  and  $\text{KCO}_3$  (2.933 g, 21.22 mmol) was added. The mixture was heated at 40 °C under argon while a solution of compound **3** (0.787 g, 4.244 mmol) in 20 mL of dry  $\text{CH}_3\text{CN}$  was added dropwise. Once the addition was completed the reaction mixture was stirred for another 5 h. The suspension was cooled down, filtered, and the solution was evaporated to dryness. The crude product was purified by column chromatography in silica gel ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  95:5) to yield compound **4b** as a white solid (1.241 g, 74%).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz): 1.38–1.41 (m, 2H); 1.45–1.57 (m, 1H); 1.58–1.69 (m, 1H); 2.10 (m, 1H); 2.26–2.49 (m, 5H); 2.56–2.75 (m, 2H); 2.76–2.87 (m, 2H); 2.88–2.95 (m, 1H); 3.00–3.15 (m, 3H); 3.26–3.38 (m, 1H); 3.53–3.62 (m, 1H); 3.60 (AB system, 2H); 3.71 (s, 3H); 7.64 (dd, 1H,  $^3\text{J} = 8.0$  Hz,  $^3\text{J} = 7.6$  Hz); 7.71 (d, 1H,  $^3\text{J} = 7.6$  Hz); 8.12 (d, 1H,  $^3\text{J} = 8.0$  Hz).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75.5 MHz): 21.4; 26.0; 40.4; 41.3; 41.7; 43.9 (d,  $^2\text{J}_{\text{C-P}} = 10.9$  Hz); 45.3 (d,  $^2\text{J}_{\text{C-P}} = 15.6$  Hz); 51.2; 52.2 ( $\text{CH}_3$ ); 52.6; 53.1; 59.9; 123.0; 126.6; 137.4; 146.3; 160.5; 165.3.  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 162.0 MHz): 25.95. MALDI-TOF (2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB):  $m/z = 393.23$  [ $\text{M}+1^+$ ]. Elem. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_3\text{P}$ : C, 54.95; H, 7.17; N, 17.80%. Found C, 55.05; H, 7.39; N, 18.21%.

2.2.3. **HTE1PA**·4HCl·EtOH. Hydrochloric acid (30 mL, 4 M) was slowly added to compound **4b** (1.241 g, 3.15 mmol), and the mixture was stirred and heated at 80 °C overnight. After cooling to room temperature and solvent evaporation the residue was dissolved in the minimum amount of water. After usual workup on ion-exchange resin DOWEX 1×2-200, **HTE1PA** is obtained as a colourless oil (830 mg, 78%).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz): 1.65–1.74 (m, 2H); 1.79–1.96 (m, 2H); 2.62–2.74 (m, 4H); 2.75–2.89 (m, 8H); 2.90–3.02 (m, 4H); 3.68 (s, 2H); 7.38 (d, 1H,  $^3\text{J} = 7.5$  Hz); 7.70 (d, 1H,  $^3\text{J} = 7.6$  Hz); 7.83 (dd, 1H,  $^3\text{J} = 7.5$  Hz,  $^3\text{J} = 7.6$  Hz).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 75.5 MHz): 26.0; 27.3; 47.4; 48.2; 49.0; 49.8; 52.3; 52.5; 55.6; 57.2; 60.2; 125.1; 128.6; 141.3; 157.3; 160.1; 176.3. MALDI-TOF (dithranol):  $m/z = 335.23$  [ $\text{M}+1^+$ ]. Hydrochloric acid (12 M) was slowly added dropwise to a solution of the free amine **TE1PA** dissolved in the minimum amount of absolute ethanol. The resulting precipitate was filtered off and washed with warm ethanol (3×10 mL). Hydrochloric acid (1 M) was added to the residue, the solvent was evaporated, and the solid was dried under vacuum at 80 °C during 24 h to give the expected compound as the hydrochloride salt.

## Scheme 1

### 2.3 Radiolabeling and Radiochemistry

#### 2.3.1. Instrumentation and Methods

Copper-64 dichloride in 0.1 M hydrochloric acid was obtained from the ARRONAX cyclotron (Saint-Herblain, France). Radionuclidic purity was determined by gamma spectroscopy using a DSPEC-JR-2.0 type 98-24B HPGE detector (AMETEK) and chemical purity was controlled by ICP-OES with an iCAP 6500 DUO (Thermo Fisher Scientific). For radiolabeling, ammonium acetate, hydrochloric acid

30% and sodium hydroxide pellets were purchased as trace select grade from Fluka Analytical. A.C.S reagents – Ammonium chloride, ammonium sulphate, HEPES and HEPES potassium salt, sodium chloride, sodium acetate – and bovine recombinant (E.Coli) superoxide dismutase (SOD), bovine serum albumine (BSA), 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA) were purchased from Sigma-Aldrich. Methanol HPLC grade, acetonitrile gradient grade, were from Fisher Chemical and absolute ethanol anhydrous from Carlo Erba. Water (18.2 M $\Omega$ .cm) was obtained from a Milli-Q® Gradient system (Millipore). Human serum was supplied by Nantes university hospital biology platform. Protease Inhibitors - aprotin, leupeptin and AEBSF - were purchased from Interchim. Animal experiments were carried out in compliance with French regulation and approved by Ethics Committee for animal experimentation-Région Pays de la Loire (approval number: B-44-278) as protocol n° CEEA.2012.271. Mature (14-17 weeks old) female BALB/c wild were purchased from Janvier (Le Genest St Isle, France). Mice were housed under standard conditions (standard diet and water ad libitum) and maintained in post-entry quarantine for 15 days before experiments.

### 2.3.2. Chromatographic analyzes

HPLC analyses were performed on two different systems. HPLC system 1 consists of an Eckert&Ziegler HPLC Module, Modular-Lab software, Knauer pumps K120, Knauer HPLC Degasser, Knauer smartline UV 2520 ( $\lambda = 227$  nm), Eckert&Ziegler detector shielding module and ACE C18 column (3  $\mu$ , 150 x 3 mm). The elution gradient applied to HPLC system 1 includes 3 stages: 100% of acetate buffer 0.05M pH 4.5 over 2.5 min, 0 to 10% enrichment of acetonitrile in 15 min, and 100% acetonitrile over 2.5 min, flow-rate: 0.5 mL/min. HPLC system 2 were dedicated to the liver metabolism analyses and consists of a Waters 600 controller module, Empower pro 1154 software, Waters 600 quaternary pump, Waters 487 UV detector and Gilson FC203B fraction collector. Radioactive species were separated using a gel-filtration column (GE Healthcare Life Science Superose 12 10/300 GL) eluted isocratically with 20 mM HEPES buffer and 150mM NaCl (pH 7.3) during 60 min, flow rate: 0.5 mL/min. The calibration of gel-filtration column was conducted using three standards with molecular weight of 32.6 kD, 66 kD and 150 kD, corresponding to molecular weight of respectively SOD, BSA and a standard IgG. The collected fractions were counted using a Wallac 1480-Wizard® 3 gamma counter (Perkin Elmer).

TLC analyses were performed using silica gel on TLC-PET foils (Fluka analytical). The eluents used were a mixture of ammonium chloride (20% in water) and methanol (1:1) in TLC system 1 and a mixture of ammonium acetate (10% in water) and methanol (1:1) in TLC system 2. TLC plates were revealed on a storage phosphor screen using a Cyclone® Plus phosphor imager (Perkin Elmer).

### 2.3.3. Radiolabeling

Chelates radiolabeling were achieved by addition of 50  $\mu$ L  $^{64}\text{CuCl}_2$  solution (40 to 60 MBq; metal composition: 10 ppm of copper for 60 ppm total metals) to a mixture of 50  $\mu$ L of 0.1 M sodium hydroxide and 500  $\mu$ L of 1 mM HTE1PA or DOTA solutions in 0.1 M ammonium acetate. Reaction mixtures were stirred at room temperature (r.t.) during 15 min for HTE1PA and 30 min at 80°C for DOTA. [ $^{64}\text{Cu}$ ]acetate was obtained by addition of 50  $\mu$ L  $^{64}\text{CuCl}_2$  solution to a mixture containing 50  $\mu$ L of 0.1 M sodium hydroxide and 500  $\mu$ L of 0.1 M ammonium acetate. Reaction mixture was stirred at r.t. during 30 min. Radiochemical purity of [ $^{64}\text{Cu}$ ]TE1PA solution was controlled with both TLC system 1 and HPLC system 1. In the case of [ $^{64}\text{Cu}$ ]DOTA, controls were performed with TLC system 2 and HPLC system 1. [ $^{64}\text{Cu}$ ]acetate was taken as reference in all chromatographic systems.

SOD radiolabeling was performed by adding 5  $\mu$ L  $^{64}\text{CuCl}_2$  solution (4 to 6 MBq) to 50  $\mu$ L ammonium acetate 0.1 M, 5 $\mu$ L 0.1 N sodium hydroxide and 150  $\mu$ L 6.66 mg/mL SOD in NaCl 0.9 M. Reaction mixture was stirred at r.t. during 1 hour and injected in HPLC system 2.

## 2.4 *In Vitro* plasma stability

200  $\mu$ L of the HTE1PA radiolabelled solution were added to 800  $\mu$ L of human serum, in duplicate. A first sample was incubated at 37°C and the second was stored at 4°C, respectively to promote or inhibit the enzyme activity. Also, 200  $\mu$ L of [ $^{64}\text{Cu}$ ]acetate were added to 800  $\mu$ L of human serum as a control mixture. Stability of [ $^{64}\text{Cu}$ ]TE1PA was monitored at 3 h, 12 h and 24 h after incubation. First, a gel filtration was conducted - with GE Healthcare Life Science disposable PD-10 columns, eluted

with 500  $\mu\text{L}$  volumes of 0,1 M acetate buffer (pH 5) - in order to check whether  $^{64}\text{Cu}$  remains complexed by HTE1PA or if it binds to serum proteins. Second, HPLC was performed, to control the occurrence of radiolabelled degradation products as well as free  $^{64}\text{Cu}$ . For that, 100  $\mu\text{L}$  of a solution of saturated ammonium sulfate were added to 100  $\mu\text{L}$  of serum in an eppendorf tube and vortexed, in order to precipitate proteins. After centrifugation at 9000 rpm for 2 min at r.t., the supernatant was separated from the pellet and both were counted. Subsequently, the supernatant was analyzed using HPLC system 1 (20  $\mu\text{L}$  injected) and TLC system 1.

## 2.5 *In Vivo* studies

### 2.5.1 *Biodistribution and pharmacokinetic*

Female BALB/c mice (n=10 per group; body weight  $20.4 \pm 1.2$  g) were injected via the tail vein with 3.3-3.6 MBq in 150  $\mu\text{L}$  of [ $^{64}\text{Cu}$ ]TE1PA (21.4  $\mu\text{g}$ ), [ $^{64}\text{Cu}$ ]DOTA (19.8  $\mu\text{g}$ ) or [ $^{64}\text{Cu}$ ]acetate. The dose was diluted in 0.1 M ammonium acetate and the syringes were weighted prior and following the injection. Four animals have undergone blood sampling while others were sacrificed to study the biodistribution at selected time points postinjection (PI) (n=3). Animals for the late biodistribution were placed in metabolism cages until sacrifice. Following sacrifice, blood and the major organs were collected, weighted and counted, except for animals used to study the blood pharmacokinetics (PK). The counts in the tissue samples were decay-corrected and calibrated, by comparison with the counts in aliquots (n=3) of a dilution of the injected dose, which were counted at the same time. The activity in the selected tissues and organs was expressed as the percentage of the injected dose per gram of organ (% ID/g).

PK parameters (apparent half-life in the bloodstream and steady state distribution volume) were calculated using the previously described method [26].

### 2.5.2 *Metabolism*

The metabolism study of [ $^{64}\text{Cu}$ ]TE1PA, [ $^{64}\text{Cu}$ ]DOTA and [ $^{64}\text{Cu}$ ]acetate in the liver was assessed using the slightly modified method from Bass et al [14] and performed on the animals sacrificed at 2 h PI for the biodistribution study. Half of the harvested liver was rinsed with precooled physiological saline and homogenized on ice in 65:35 ethanol/0.1 M ammonium acetate added with protease inhibitors (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 4 mM AEBSF) using a PTFE-inox pellet piston and a 15 mL falcon tube (Fisher Scientific) as a tissue grinder. Ultracentrifugation was conducted with an Optima<sup>TM</sup>TLX ultracentrifuge (Beckman Coulter) using a TLA110 rotor.

After ultracentrifugation of the homogenate at 23500 g for 30 min at 4°C, the supernatant was separated from the pellet and both were counted. The supernatant was filtered (0.45  $\mu$ ) and analyzed using HPLC system 2 (200  $\mu\text{L}$  injected) and TLC system 1. A radioactivity balance was performed for each sample run on the HPLC system, by comparing the total activity eluted to the activity in 200  $\mu\text{L}$  of supernatant counted at the same time. As a control, this protocol was applied to liver from non injected animals added ex vivo with [ $^{64}\text{Cu}$ ]TE1PA or [ $^{64}\text{Cu}$ ]acetate injectate prior to homogenization.

### 2.5.3 *Statistical analyses*

In order to determine if two sets of data were significantly different, unpaired t-test were performed at 5 % significance level. Unless otherwise specified, all tests were two-tailed.

## 3. *Results*

### 3.1 *Synthesis of TE1PA*

Two different ways can be followed to obtain easily and with high yield the cyclam derivative TE1PA (Scheme 1). Both are applying different *N*-protection strategy to lead to the selective-mono-*N*-functionalization of the macrocycle by one picolinate pendant arm.

The first one involved the preliminary synthesis of the diformyl cyclam [23] which was reacted in acetonitrile with an excess of **3** to give the bisaminal ammonium salt derivative **4a**. Surprisingly, the electrophilic reagent is not reactive enough to give, as usually observed, the trans-di-*N*-alkylation. The addition of sodium iodate was necessary to activate the reaction which only formed the mono-

ammonium derivative in acceptable yields. Indeed, **4a** progressively precipitated as it was formed and was isolated with a mixture of salts (NaCl and NaI). After treatment with NaOH and extraction, the deprotected methyl ester derivative, not stable, was directly hydrolyzed with 4 M HCl to give HTE1PA with an overall yield of 58%.

The synthesis of TE1PA can also started from cyclam **1b**, and involved the preparation of the triprotected phosphoryl [25] derivative **2b**, which was reacted with **3** to give the triprotected cyclam derivative **4b** in 74% yield. The desired ligand HTE1PA was isolated with an overall yield of 55% after complete deprotection of the phosphoryl and methyl ester groups with 4 M HCl.

### 3.2 Radiolabeling

HTE1PA was successfully radiolabelled at r.t. in less than 15 min. Radiochromatograms are presented in fig. 4 and 5. Both TLC and HPLC chromatograms showed a single radiolabelled species of greater than 99 % yield. The tests carried out to optimize the labelling also showed that HTE1PA could be radiolabelled even using a 0.01 mM ligand concentration. DOTA was also radiolabelled with a yield higher than 99% by heating at 80°C during 30 min, using a 1 mM ligand solution. With a 0.025 mM ligand concentration, radiolabeling yield fell to 75 %.

### 3.3 *In vitro* stability

In this work, we sought to demonstrate that the HTE1PA ligand forms stable complexes with copper-64, which will make it suitable for radiopharmaceutical applications. For this purpose, the stability was first assessed *in vitro* by incubation of [<sup>64</sup>Cu]TE1PA complex in human serum by conducting gel filtration, CCM and HPLC chromatography analysis. This study has demonstrated a complete stability of [<sup>64</sup>Cu]TE1PA over 24 h at 4°C as well as at 37°C. According to fig. 3, the gel filtration analyzes of the serum samples showed a single peak, at 6.5-7 ml elution volume, corresponding to that observed for the [<sup>64</sup>Cu]TE1PA solution. Additionally, no radioactivity was eluted in the early volume (3 to 4.5 ml) as for the [<sup>64</sup>Cu]acetate control serum. This reveals no presence of copper-64 bound to proteins and consequently that no decomplexation phenomenon occurred.

TLC and HPLC radiochromatograms, given in fig. 4 and 5, showed one species matching respectively with the R<sub>f</sub> (0.3) and the retention time (approx. 10 min) of [<sup>64</sup>Cu]TE1PA as determined by analysis of the [<sup>64</sup>Cu]TE1PA solution. Furthermore, no free <sup>64</sup>Cu was observed at the retention time of 2 min and R<sub>f</sub> of 0.9-1. It should be noted that the mean percentage of the radioactivity recovered after serum precipitation was about 58 %. This should not nevertheless be interpreted as a fixation of Cu-64 on proteins, but rather as a non-specific adsorption of [<sup>64</sup>Cu]TE1PA in the pellet caused by the extraction method, since, given the previously described results of gel filtration analysis, there is clearly no protein binding before the precipitation step.

### 3.4 *Biodistribution and pharmacokinetic*

Having demonstrated excellent stability over 24 h *in vitro*, [<sup>64</sup>Cu]TE1PA has been assessed for its *in vivo* behavior by biodistribution and PK studies in mice. These studies were carried out in BALB/c mice in comparison with control groups of similar size (n=3-4) injected either with [<sup>64</sup>Cu]acetate or with [<sup>64</sup>Cu]DOTA.

The biodistribution and PK of free <sup>64</sup>Cu is in fact not well described in BALB/c mice, it thus seemed essential to inject animals with copper-64 acetate to obtain this reference. Likewise, injection of [<sup>64</sup>Cu]DOTA has been performed in another group as a reference, since DOTA is a widely studied ligand.

Figure 6 presents the biodistribution data at 2 h and 24 h PI of 3.3-3.6 MBq of [<sup>64</sup>Cu]acetate, [<sup>64</sup>Cu]TE1PA and [<sup>64</sup>Cu]DOTA. Data obtained for [<sup>64</sup>Cu]acetate showed an accumulation of the radioactivity in almost all organs with a maximum in the liver (23.26±3.27 at 2 h and 20.74±4.97 %ID/g at 24 h), but also in kidneys, intestine, lung and stomach for those the %ID/g is greater than 10 % at 2h (respectively 14.93±8.70, 12.17±3.16, 10.92±3.50, 11.22±0.76 %ID/g). The data obtained at late time of 24 h showed a very low clearance of [<sup>64</sup>Cu]acetate for all organs compared to the early time (2 h), which is to be related with a stable copper fixation on proteins such as SOD, ceruloplasmin or metallothioneins [14].

Biodistribution data for [<sup>64</sup>Cu]TE1PA demonstrated a very few accumulation in the principal organs at 2 h, except in the liver (10.21±2.04 %ID/g) and kidneys (12.39±0.21 %ID/g). In comparison, the

Fig. 3

Fig. 4 &  
5

Fig. 6

values obtained for the [<sup>64</sup>Cu]DOTA at the same time were respectively of 2.16±0.18 and 2.84±0.51 %ID/g, so almost 5 times less. This significant difference (p < 0,003) can be explained by the greater lipophilicity of HTE1PA as well as by the different overall charge of the complexes (+1 for [<sup>64</sup>Cu]TE1PA and -2 for [<sup>64</sup>Cu]DOTA) which tend to a largest retention in the liver and kidneys of [<sup>64</sup>Cu]TE1PA [27].

The data at 24 h showed a remarkable clearance of [<sup>64</sup>Cu]TE1PA between 2 h and 24 h PI. The remaining radioactivity was indeed 1.47±0.18 %ID/g in liver and 2.68±0.15 %ID/g in kidneys, which is respectively 7 times less and almost 5 times less than at 2 h (p<0.002). This reveals an effective resistance of [<sup>64</sup>Cu]TE1PA to transchelation towards proteins competing for the chelation of copper, especially SOD in the liver. Regarding [<sup>64</sup>Cu]DOTA, no clearance was observed in the liver (p=0.12) and uptake at 24 h was finally significantly inferior for [<sup>64</sup>Cu]TE1PA than [<sup>64</sup>Cu]DOTA (p<0.02). The clearance in the kidneys was very limited (p=0.006) i.e. 57.4 % of the uptake at 2h.

Furthermore, the data for the other organs of interest at 24 h showed an uptake consistently lower (p<0.03; one-tailed) for [<sup>64</sup>Cu]TE1PA than for [<sup>64</sup>Cu]DOTA. This should be attributed to a transchelation of copper-64 from DOTA to proteins. Such transchelation does not necessarily occur in these organs but rather in the liver, where copper is incorporated into carrier proteins – mainly ceruloplasmin – which are then exported in the blood to supply copper to the peripheral organs [28]. Indeed, residual blood activity at 24 h was significantly higher (p=0.0008; one-tailed) for [<sup>64</sup>Cu]DOTA compared to [<sup>64</sup>Cu]TE1PA (0.22±0.038 %ID/g and 0.077±0.002 %ID/g respectively).

The calculated elimination half-live for [<sup>64</sup>Cu]TE1PA was about 21 min while it was about 16 min for [<sup>64</sup>Cu]DOTA. The steady state volume were 185 and 140 ml respectively, which is in accordance with the previously described greater early accumulation of [<sup>64</sup>Cu]TE1PA. Separation of feces and urine in the metabolism cage showed that [<sup>64</sup>Cu]TE1PA was eliminated more than 80% in the urine while 95% of [<sup>64</sup>Cu]acetate was eliminated in feces.

### 3.5 Metabolism

The metabolism protocol has allowed assessing the molecular weight of the radiolabelled species trapped in the liver. It has been performed on animals sacrificed at 2 h PI, where the most significant biodistribution difference was observed between mice injected with [<sup>64</sup>Cu]TE1PA or [<sup>64</sup>Cu]DOTA. The analysis of a liver from a non injected mice, added ex vivo with [<sup>64</sup>Cu]TE1PA, demonstrated that the protocol itself can not induce the decomplexation of copper-64 from the ligand.

Liver extract of mice injected with [<sup>64</sup>Cu]acetate showed three major copper-64 labeled protein species (see fig. 7) in agreement with the chromatographic profile obtained by Bass et al. [14]. The fraction eluted at 29 min matches accurately the main peak obtain for the [<sup>64</sup>Cu]SOD, whereas fractions 23 min and 35 min correspond to molecular masses of 130-150 kDa and about 10 kDa respectively. This latter fraction may correspond to metallothioneins (MT).

[<sup>64</sup>Cu]TE1PA sample resulted in more than 90 % of the activity eluted as molecules of less than 2 kDa. These can be attributed to the intact TE1PA complex since the TLC profile showed that almost all the activity migrated with the same R<sub>f</sub> as the [<sup>64</sup>Cu]TE1PA reference. Only 8 % (fractions 21 to 36 min) may correspond to radiolabelled proteins.

Liver extract of mice injected with [<sup>64</sup>Cu]DOTA showed a main peak consistent with radiolabelled SOD. The profile is very noisy as the analysis was performed 12 hours later for organizational reasons. In addition, it should be noted that the activity found in the supernatant accounted for 45.02 ± 4.21 % of the total liver homogenate activity. In comparison, 77.18 ± 5.18 % and 46.34 ± 5.60 % of the activity were extracted for the [<sup>64</sup>Cu]TE1PA and [<sup>64</sup>Cu]acetate liver homogenate respectively. It can be assumed that these differences in extraction efficiency is due to the formation of protein aggregate, being found in the pellet after centrifugation. This explains the highest extraction efficiency for the [<sup>64</sup>Cu]TE1PA liver homogenate, in which copper-64 binding to proteins is very limited.

The metabolism study has thus confirmed that the largest distribution of radioactivity in the liver of mice injected with [<sup>64</sup>Cu]TE1PA, at 2 h PI, is to be related to the intrinsic properties of the complex, i.e. lipophilicity and charge, and not to transchelation.

## 4. Discussion

Our group has recently proposed *N*-alkylation of polyaza macrocycles by a picolinate pendant arm as an alternative to conventional carboxylate or phosphine moieties for copper chelators [22,29]. In [22], we showed that the cyclam-based ligand HTE1PA met most of the requirements of a good copper chelator with respect to natural copper complexation. On this basis, the goal of this work was to investigate the radiolabeling of HTE1PA with copper-64 and to assess the in vitro and in vivo stability of [<sup>64</sup>Cu]TE1PA in comparison to [<sup>64</sup>Cu]acetate and [<sup>64</sup>Cu]DOTA – most widely used as a reference. As expected from [22], due to the positive contribution of the picolinate moiety on the acid-base properties of HTE1PA, we observed a fast complexation of copper-64 and a quantitative yield at r.t. with HTE1PA, whereas the radiolabeling of DOTA requires an important excess of ligand (30 mM) and a minimum of 45 min to achieve 95 % yield in the same temperature condition [27]. To overcome this limitation, under our experimental conditions, DOTA radiolabeling was performed by heating at 80°C for 30 min to ensure an equivalent yield as with HTE1PA. Moreover, radiolabeling assays has demonstrated that HTE1PA complexing capacity was maintained with a very restricted excess of ligand: radiolabeling with a 10 micromolar HTE1PA solution led to a 95 % yield at r.t. This demonstrates the outstanding selectivity of HTE1PA for copper(II) relative to other divalent cations (contaminants) such as Fe<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and especially Zn<sup>2+</sup>, since the ratio HTE1PA/total metals was below 1. This result can be explained by the size of the cavity that is better suited to copper(II) than to other metal ions and is in accordance with the difference of thermodynamic stability constants (p[Cu<sup>2+</sup>] = 18.64 vs. p[Zn<sup>2+</sup>] = 12) previously measured with natural copper(II) and zinc(II) [22]. To our knowledge, such selectivity has only been described for the hexamine sarcophagine derivative [30] and is especially valuable in the context of antibody radiolabeling to get a high specific activity despite the presence of metal contaminants brought in varying amounts by the solution of copper-64 from one production to another.

No in vitro decomplexation was observed during the 24 h incubation of [<sup>64</sup>Cu]TE1PA in human serum, at 37°C. This was not unexpected given the important inertness (kinetic and in reducing medium) observed for [<sup>nat</sup>Cu]TE1PA [22] and the in vitro stability result described for [<sup>64</sup>Cu]DOTA in similar conditions [31]. The in vivo biodistribution study of [<sup>64</sup>Cu]TE1PA showed a significant uptake in both the liver and kidneys at the early biodistribution time (2h). Such behavior is not necessarily an indication of in vivo instability and can be associated to the physico-chemical properties of the complexe. At first, even if partition coefficient was not measured, the picolinate pendant arm - instead of carboxylate or phosphine - should provide a greater lipophilicity to the [<sup>64</sup>Cu]TE1PA which results in a partial elimination by the liver as confirmed by the metabolism cage experiment (about 20 % fecal elimination), consistent with the significant initial liver uptake. Second, [<sup>64</sup>Cu]TE1PA has a positive overall charge which is known to lead to significantly higher uptake in both liver and kidneys, as do sarcophagines derivatives complex [32], in comparison to negatively charged (like [<sup>64</sup>Cu]DOTA) or neutral complexes [27]. It can be noted that this does not constitute a drawback for TE1PA ligand since positive charge usually highly improves the binding affinity of peptides, for instance, as described by Maecke and coll. for bombesin based peptides [33].

The elimination of an unconjugated copper-64 complex through the hepatic route is not particularly desirable especially because the ligand is in competition with high amounts of copper metalloproteins - for the complexation of the <sup>64</sup>Cu<sup>2+</sup> - in the copper key metabolism organ that is the liver. In this context, fast renal elimination is usually preferred to minimize the hepatic pass, thus assorted with a high copper transchelation probability. This kind of elimination is observed for [<sup>64</sup>Cu]DOTA and result in a reasonably low liver uptake at 2 h biodistribution but with a weak clearance to 24 h PI. It should be noticed that the uptake of [<sup>64</sup>Cu]DOTA at 2 h in the liver and kidneys was substantially higher than those observed in a previous study being performed in the same animal model: respectively 1.7 and 2.2-fold [20]. These differences can be explained by the specific activity of DOTA complexes and variability in the animal model (e.g. animal weight and sample size).

Despite the significant [<sup>64</sup>Cu]TE1PA initial uptake in the liver and kidneys, the biodistribution at 24 h highlighted a remarkable clearance for both organs compared to [<sup>64</sup>Cu]DOTA. Similar results were found with CB-TEAMA a derivative of CB-TE2A – known for its exceptional in vivo inertness [18,19,33-37] – which amidification of one carboxylate coordination moiety conducted to an increase of the lipophilicity, liver and kidneys uptake at 30 min PI (respectively 7.4 and 2-fold higher) and to a huge liver and kidneys clearance from 30 min to 24h (respectively 93.3% and >90%) [39]. Such behavior demonstrates that an early uptake in the liver is not correlated with a poor in vivo stability

when the complex has a strong resistance to transchelation. For [<sup>64</sup>Cu]TE1PA, this was confirmed by the metabolism study: at 2 h, more than 90 % of the liver uptake was found to match the intact form of the [<sup>64</sup>Cu]TE1PA complex, whereas for [<sup>64</sup>Cu]DOTA almost all the activity was associated to metalloproteins, especially SOD.

The resistance to transchelation is one key point of the in vivo stability of copper-64 complexes. The intrinsic complex elimination is not representative of the context of the phenotypic imaging application. This latter implicates the conjugation of the complex to a macromolecule of high molecular weight, which imposes its own pharmacokinetics, i.e. about 2-4 days in the case of an entire antibody [40]. The increase of the residence time of the conjugated antibody in blood results in a huge increase of the hepatic passes. In this context, a complex with a poor resistance to transchelation, especially towards hepatic metalloproteins, will lead to a progressive non specific uptake in the liver and therefore to a contrast diminution of the immuno-PET image in the liver environment. On the other hand, the effective resistance to transchelation of [<sup>64</sup>Cu]TE1PA shown in this study offers encouraging perspectives concerning the in vivo stability of antibody radiolabeling.

Therefore, the next steps of this work will be to introduce an additional binding function on the HTE1PA skeleton, in order to verify this latter hypothesis and to achieve the proof-of-concept of indirect copper-64 radiolabeling using HTE1PA for phenotyping imaging.

## 5. Conclusion

DOTA and in general DOTA “like” derivatives are probably the most currently prized copper-64 chelators in the aim to form radiopharmaceuticals, but it is now well recognized that they do not meet the strict specifications of the applications in nuclear medicine, especially in terms of in vivo inertness. If new chelating agents, as the constrained CB-TE2A or Sar macrocycles appeared as attractive copper chelators, they still present some drawbacks [21] which warrants the continuation of research in this area. With this in mind picolinate mono *N*-functionalization of cyclam has been achieved with high yield using two synthetic routes. After a first investigation for cold copper complexation [22], the new ligand, named HTE1PA was proved to be a remarkable copper-64 chelator and further an appealing alternative to bridged ligands e.g. CB-TE2A or Sar derivatives. Each behavior pointed up in our preliminary approach with natural copper was proved to be directly linked to the good properties of the copper-64 chelate. The in vivo resistance to transchelation of [<sup>64</sup>Cu]TE1PA indeed demonstrates that a monopicolinate pendant arm can increase the in vivo inertness of cyclam-based copper complexes compared with previous works with cyclam or derivatives [12], [33]. Additionally, the positive charge of the chelate should be an advantage for specific applications [33]. From this observations, HTE1PA must be grafted on antibodies or peptides to prove the interest of picolinate derivatives in either immuno-PET or RIT. Thereby many possibilities can be considered: i) *N*-functionalization via one of the three secondary amines, ii) *C*-functionalization either by carbon atom of the macrocycle or from the aromatic ring or iii) simply an in situ reaction of the non coordinating carboxylate of the picolinate pendant arm. Works are currently in progress in this aim.

## 6. Acknowledgement

AFC and MF thanks the LABEX IRON (ANR-LABX) operated by the French National Research Agency (ANR) within the program “Investissements d’Avenir” and the University Hospital Center of Nantes (CHRU de Nantes) for financial support. They also thank Catherine Saï-Maurel for her help with the animal experiments and Patricia Le Saëc for technical assistance. RT thanks the Centre National de la Recherche Scientifique, the Ministère de l’Education Nationale et de la Recherche Scientifique and the ‘Services Communs’ of the University of Brest for NMR facilities

## References



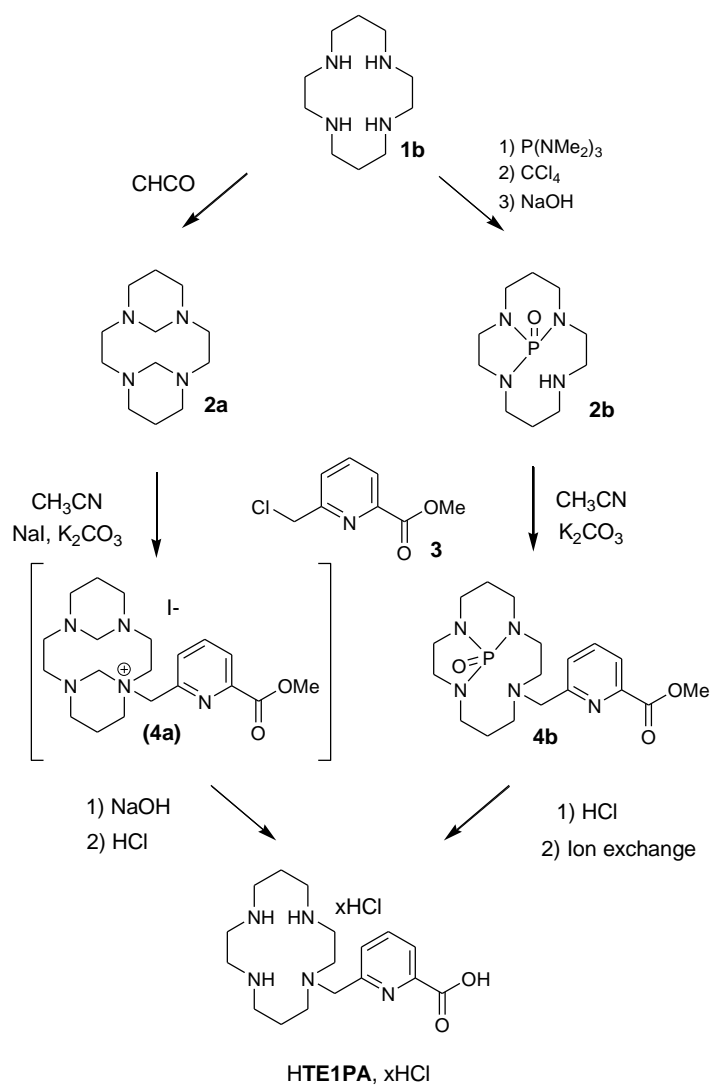
- [1] Ramogida CF, Orvig C. Tumour targeting with radiometals for diagnosis and therapy. *Chem Commun Camb Engl* 2013;49:4720–39.
- [2] Mewis RE, Archibald SJ. Biomedical applications of macrocyclic ligand complexes. *Coord Chem Rev* 2010;254:1686–712.
- [3] Boros E, Cawthray JF, Ferreira CL, Patrick BO, Adam MJ, Orvig C. Evaluation of the H2 dedpa Scaffold and its cRGDyK Conjugates for Labeling with  $^{64}\text{Cu}$ . *Inorg Chem* 2012;51:6279–84.
- [4] Cowley AR, Dilworth JR, Donnelly PS, Heslop JM, Ratcliffe SJ. Bifunctional chelators for copper radiopharmaceuticals: the synthesis of [Cu(ATSM)-amino acid] and [Cu(ATSM)-octreotide] conjugates. *Dalton Trans Camb Engl* 2007;(2):209–17.
- [5] Juran S, Walther M, Stephan H, Bergmann R, Steinbach J, Kraus W, et al. Hexadentate bispidine derivatives as versatile bifunctional chelate agents for copper(II) radioisotopes. *Bioconjug Chem* 2009;20:347–59.
- [6] Ruloff R, Tóth É, Scopelliti R, Tripier R, Handel H, Merbach AE. Accelerating water exchange for GdIII chelates by steric compression around the water binding site. *Chem Commun* 2002;(22):2630–1.
- [7] El Hajj F, Sebki G, Patinec V, Marchivie M, Triki S, Handel H, et al. Macrocyclic-Based Spin-Crossover Materials. *Inorg Chem* 2009;48:10416–23.
- [8] Patinec V, Rolla G, Botta M, Tripier R, Esteban-Gómez D, Platas-Iglesias C. Hyperfine Coupling Constants on Inner-Sphere Water Molecules of a TACN-based Mn(II) Complex and Related Systems Relevant as MRI Contrast Agents. *Inorg Chem* 2013; Accepted Manuscript ID: ic-2013-014366.R2
- [9] Fani M, Del Pozzo L, Abiraj K, Mansi R, Tamma ML, Cescato R, et al. PET of somatostatin receptor-positive tumors using  $^{64}\text{Cu}$ - and  $^{68}\text{Ga}$ -somatostatin antagonists: the chelate makes the difference. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med* 2011;52:1110–8.
- [10] Brechbiel MW. Targeted alpha-therapy: past, present, future? *Dalton Trans* 2007;(43):4918–28.
- [11] Wadas TJ, Wong EH, Weisman GR, Anderson CJ. Copper chelation chemistry and its role in copper radiopharmaceuticals. *Curr Pharm Des* 2007;13:3–16.
- [12] Anderson CJ, Ferdani R. Copper-64 radiopharmaceuticals for PET imaging of cancer: advances in preclinical and clinical research. *Cancer Biother Radiopharm* 2009;24:379–93.
- [13] Delgado R, Félix V, Lima LM, Price DW. Metal complexes of cyclen and cyclam derivatives useful for medical applications: a discussion based on thermodynamic stability constants and structural data. *Dalton Trans* 2007;(26):2734–45.
- [14] Bass LA, Wang M, Welch MJ, Anderson CJ. In vivo transchelation of copper-64 from TETA-octreotide to superoxide dismutase in rat liver. *Bioconjug Chem* 2000;11:527–32.
- [15] Dearling JJJ, Voss SD, Dunning P, Snay E, Fahey F, Smith SV, et al. Imaging cancer using PET—the effect of the bifunctional chelator on the biodistribution of a ( $^{64}\text{Cu}$ )-labeled antibody. *Nucl Med Biol* 2011;38:29–38.
- [16] Pfeifer A, Knigge U, Mortensen J, Oturai P, Berthelsen AK, Loft A, et al. Clinical PET of neuroendocrine tumors using  $^{64}\text{Cu}$ -DOTATATE: first-in-humans study. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med* 2012;53:1207–15.

- [17] Paudyal B, Paudyal P, Oriuchi N, Hanaoka H, Tominaga H, Endo K. Positron emission tomography imaging and biodistribution of vascular endothelial growth factor with  $^{64}\text{Cu}$ -labeled bevacizumab in colorectal cancer xenografts. *Cancer Sci* 2011;102:117–21.
- [18] Boswell CA, Sun X, Niu W, Weisman GR, Wong EH, Rheingold AL, et al. Comparative in vivo stability of copper-64-labeled cross-bridged and conventional tetraazamacrocyclic complexes. *J Med Chem* 2004;47:1465–74.
- [19] Sun X, Wuest M, Weisman GR, Wong EH, Reed DP, Boswell CA, et al. Radiolabeling and in vivo behavior of copper-64-labeled cross-bridged cyclam ligands. *J Med Chem* 2002;45:469–77.
- [20] Cai H, Li Z, Huang C-W, Park R, Shahinian AH, Conti PS. An improved synthesis and biological evaluation of a new cage-like bifunctional chelator, 4-((8-amino-3,6,10,13,16,19-hexaazabicyclo[6.6.6]icosane-1-ylamino)methyl)benzoic acid, for  $^{64}\text{Cu}$  radiopharmaceuticals. *Nucl Med Biol* 2010;37:57–65.
- [21] Anderson CJ, Wadas TJ, Wong EH, Weisman GR. Cross-bridged macrocyclic chelators for stable complexation of copper radionuclides for PET imaging. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2008;52:185–92.
- [22] Lima LMP, Esteban-Gómez D, Delgado R, Platas-Iglesias C, Tripier R. Monopicolinate cyclen and cyclam derivatives for stable copper(II) complexation. *Inorg Chem* 2012;51:6916–27.
- [23] Royal G, Dahaoui-Gindrey V, Dahaoui S, Tabard A, Guillard R, Pullumbi P, et al. New Synthesis of trans-Disubstituted Cyclam Macrocycles – Elucidation of the Disubstitution Mechanism on the Basis of X-ray Data and Molecular Modeling. *Eur J Org Chem* 1998;1998:1971–5.
- [24] Mato-Iglesias M, Roca-Sabio A, Pálinkás Z, Esteban-Gómez D, Platas-Iglesias C, Tóth É, et al. Lanthanide complexes based on a 1, 7-diaza-12-crown-4 platform containing picolinate pendants: A new structural entry for the design of magnetic resonance imaging contrast agents. *Inorg Chem* 2008;47:7840–51.
- [25] Filali A, Yaouanc J-J, Handel H. Stoichiometric Mono N-Functionalization of Tetraazamacrocycles via Phosphoryl-Protected Intermediates. *Angew Chem Int Ed Engl* 1991;30:560–1.
- [26] Frampas E, Maurel C, Remaud-Le Saëc P, Mauxion T, Faivre-Chauvet A, Davodeau F, et al. Pretargeted radioimmunotherapy of colorectal cancer metastases: models and pharmacokinetics predict influence of the physical and radiochemical properties of the radionuclide. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011;38:2153–64.
- [27] Jones-Wilson TM, Deal KA, Anderson CJ, McCarthy DW, Kovacs Z, Motekaitis RJ, et al. The in vivo behavior of copper-64-labeled azamacrocyclic complexes. *Nucl Med Biol* 1998;25:523–30.
- [28] Nevitt T, Ohrvik H, Thiele DJ. Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823:1580–93.
- [29] Roger M, Lima LMP, Frindel M, Platas-Iglesias C, Gestin J-F, Delgado R, et al. Monopicolinate-dipicolyl derivative of triazacyclononane for stable complexation of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $^{64}\text{Cu}^{2+}$ . *Inorg Chem* 2013;52:5246–59.
- [30] Smith SV. Sarar technology for the application of Copper-64 in biology and materials science. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2008;52:193–202.
- [31] Smith SV. Molecular imaging with copper-64. *J Inorg Biochem* 2004;98:1874–901.

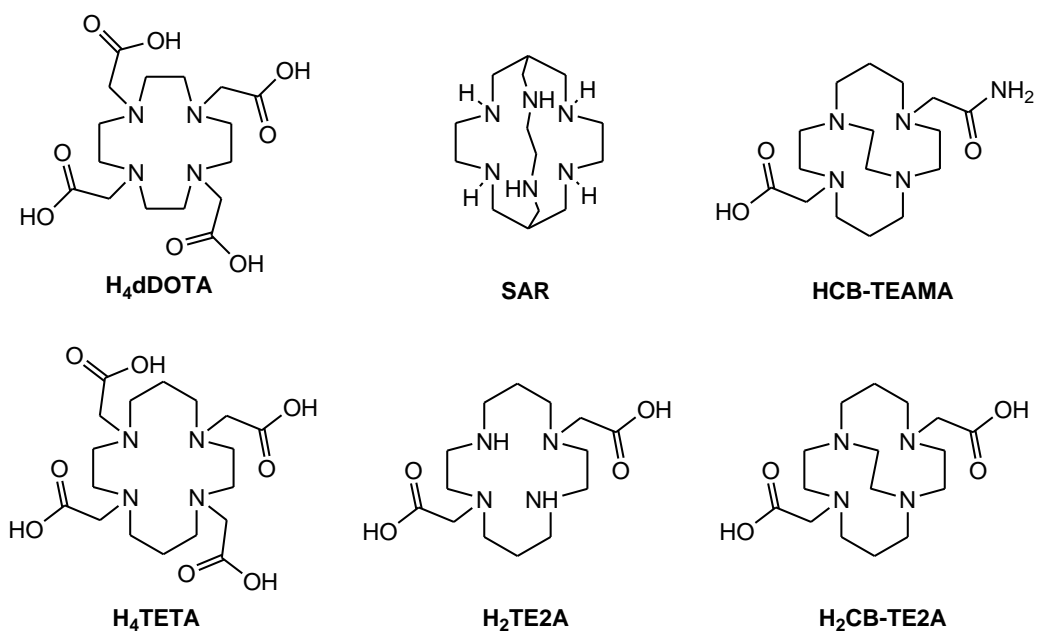
- [32] Bartolo NMD, Sargeson AM, Donlevy TM, Smith SV. Synthesis of a new cage ligand, SarAr, and its complexation with selected transition metal ions for potential use in radioimaging. *J Chem Soc Dalton Trans* 2001;(15):2303–9.
- [33] Zhang H, Abiraj K, Thorek DLJ, Waser B, Smith-Jones PM, Honer M, et al. Evolution of bombesin conjugates for targeted PET imaging of tumors. *PloS One* 2012;7:e44046.
- [34] Wei L, Ye Y, Wadas TJ, Lewis JS, Welch MJ, Achilefu S, et al. (64)Cu-labeled CB-TE2A and diamsar-conjugated RGD peptide analogs for targeting angiogenesis: comparison of their biological activity. *Nucl Med Biol* 2009;36:277–85.
- [35] Sprague JE, Peng Y, Sun X, Weisman GR, Wong EH, Achilefu S, et al. Preparation and biological evaluation of copper-64-labeled tyr3-octreotate using a cross-bridged macrocyclic chelator. *Clin Cancer Res* 2004;10:8674–82.
- [36] Garrison JC, Rold TL, Sieckman GL, Figueroa SD, Volkert WA, Jurisson SS, et al. In vivo evaluation and small-animal PET/CT of a prostate cancer mouse model using <sup>64</sup>Cu bombesin analogs: side-by-side comparison of the CB-TE2A and DOTA chelation systems. *J Nucl Med* 2007;48:1327–37.
- [37] Hausner SH, Kukis DL, Gagnon MKJ, Stanecki CE, Ferdani R, Marshall JF, et al. Evaluation of [<sup>64</sup>Cu]Cu-DOTA and [<sup>64</sup>Cu]Cu-CB-TE2A chelates for targeted positron emission tomography with an alphavbeta6-specific peptide. *Mol Imaging* 2009;8:111–21.
- [38] Kumar SR, Gallazzi FA, Ferdani R, Anderson CJ, Quinn TP, Deutscher SL. In vitro and in vivo evaluation of <sup>64</sup>Cu-radiolabeled KCCYSL peptides for targeting epidermal growth factor receptor-2 in breast carcinomas. *Cancer Biother Radiopharm* 2010;25:693–703.
- [39] Sprague JE, Peng Y, Fiamengo AL, Woodin KS, Southwick EA, Weisman GR, et al. Synthesis, characterization and in vivo studies of Cu(II)-64-labeled cross-bridged tetraazamacrocyclic-amide complexes as models of peptide conjugate imaging agents. *J Med Chem* 2007;50:2527–35.
- [40] Van Dongen GAMS, Visser GWM, Lub-de Hooge MN, de Vries EG, Perk LR. Immuno-PET: a navigator in monoclonal antibody development and applications. *Oncologist* 2007;12:1379–89.

### List of figures (captions)

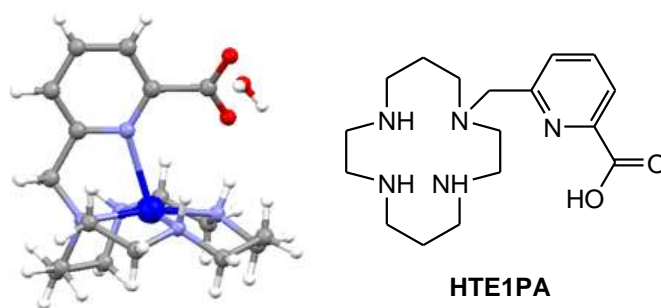
- Scheme 1: Syntheses of TE1PA following two different strategies.
- Fig. 1.:  $^{64}\text{Cu}$  and  $^{67}\text{Cu}$  chelators discussed in this manuscript.
- Fig. 2.: HTE1PA and view of the crystal structures of its copper complex  $[\text{CuTE1PA}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (contre-anions are omitted for clarity).
- Fig. 3.: Gel filtration analysis of serum samples incubate with  $^{64}\text{Cu}$ TE1PA at  $4^\circ\text{C}$  or at  $37^\circ\text{C}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ TE1PA solution, control serum ( $^{64}\text{Cu}$ acetate incubate in serum).
- Fig. 4.: TLC chromatograms of  $^{64}\text{Cu}$ TE1PA (1),  $^{64}\text{Cu}$ acetate (2) and  $^{64}\text{Cu}$ DOTA (3) labeling solutions;  $^{64}\text{Cu}$ TE1PA incubate in serum at  $37^\circ\text{C}$ , during 24 h (4); liver extract of mice injected with  $^{64}\text{Cu}$ TE1PA (2 h PI) (5).
- Fig. 5.: HPLC radio-chromatograms of  $^{64}\text{Cu}$ acetate solution (A);  $^{64}\text{Cu}$ TE1PA solution (B);  $^{64}\text{Cu}$ TE1PA incubate in serum at  $37^\circ\text{C}$  during 24 h, after protein precipitation (C).
- Fig. 6.: Biodistribution of  $^{64}\text{Cu}$ acetate,  $^{64}\text{Cu}$ TE1PA and  $^{64}\text{Cu}$ DOTA in BALB/c mice at 2 h and 24 h PI.
- Fig. 7.: HPLC chromatograms of  $^{64}\text{Cu}$ SOD solution and liver extracts from mice injected with  $^{64}\text{Cu}$ acetate (A),  $^{64}\text{Cu}$ TE1PA (B) and  $^{64}\text{Cu}$ DOTA (C), sacrificed at 2 h PI.



Scheme 1.



**Fig. 1.**



**Fig. 2.**

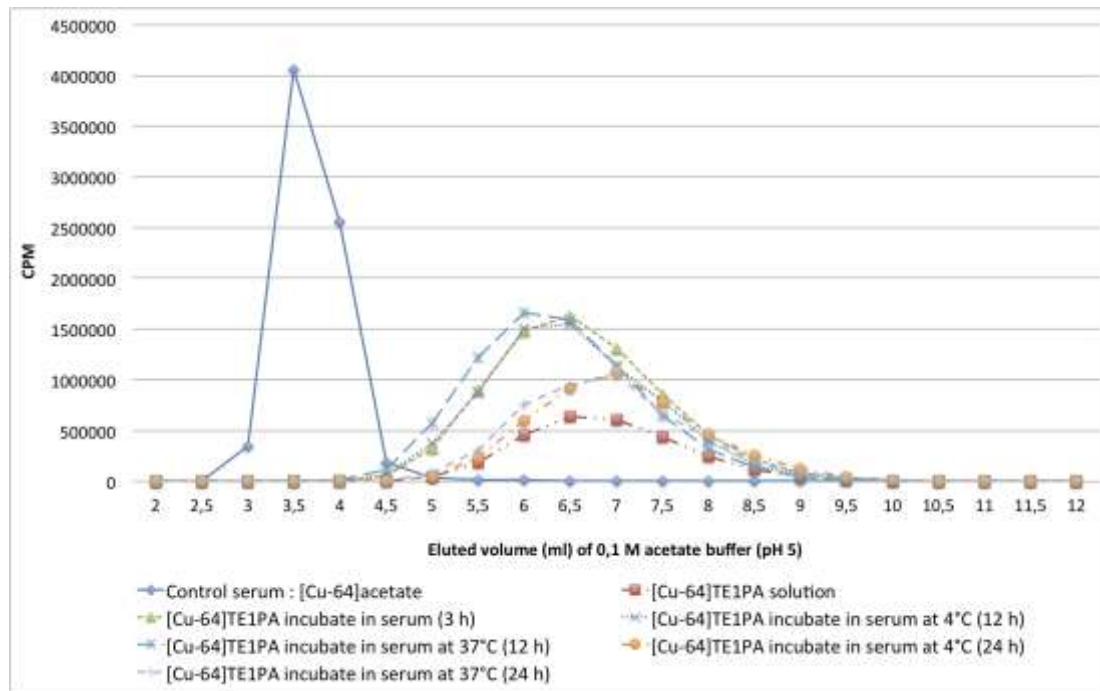


Fig. 3.

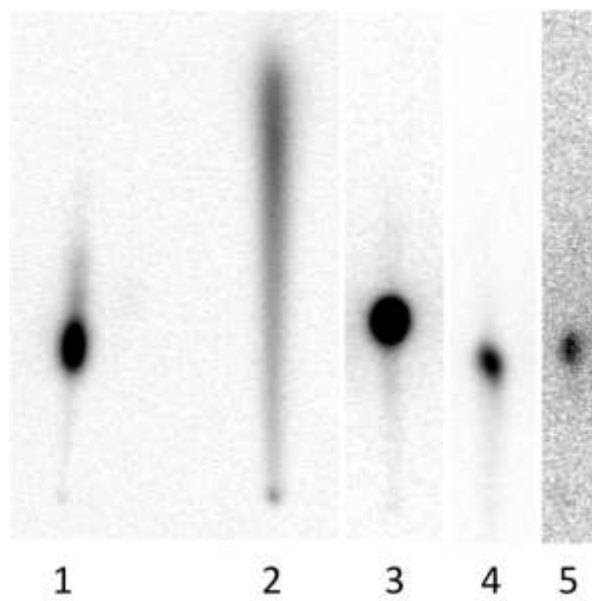
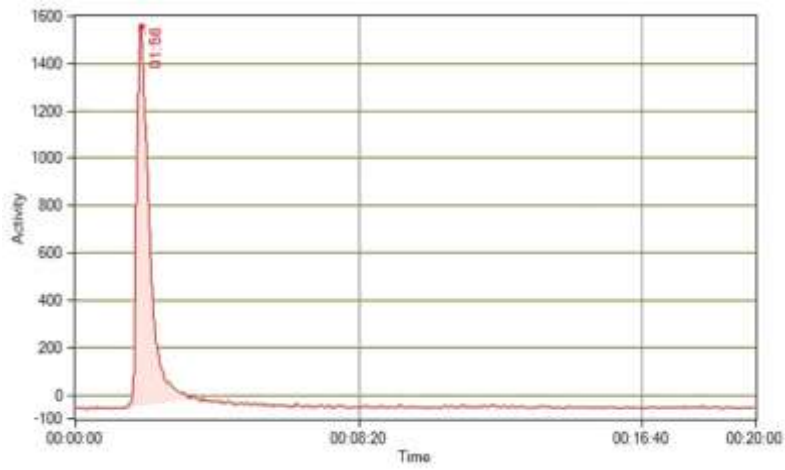
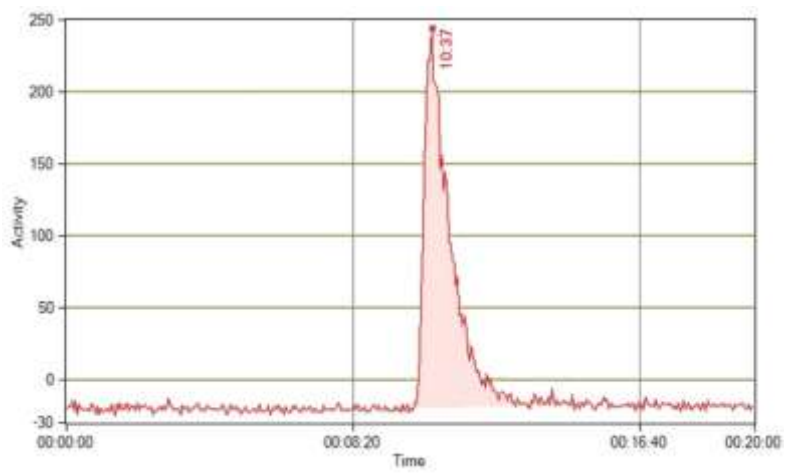


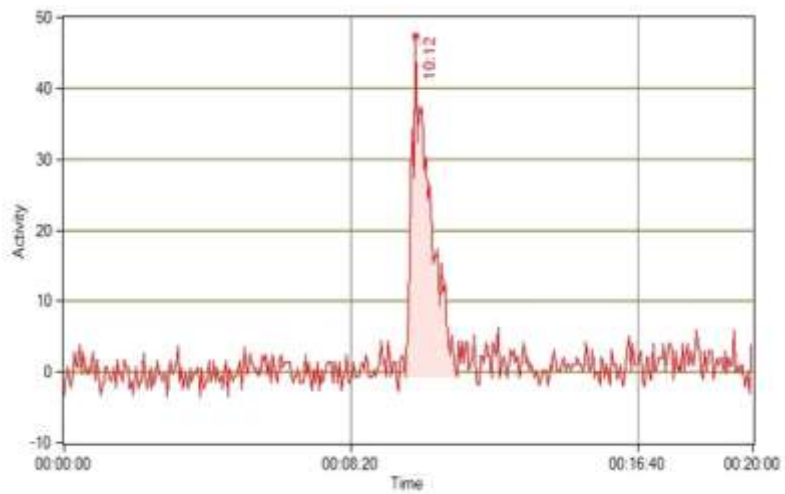
Fig. 4.



A



B



C

Fig. 5.



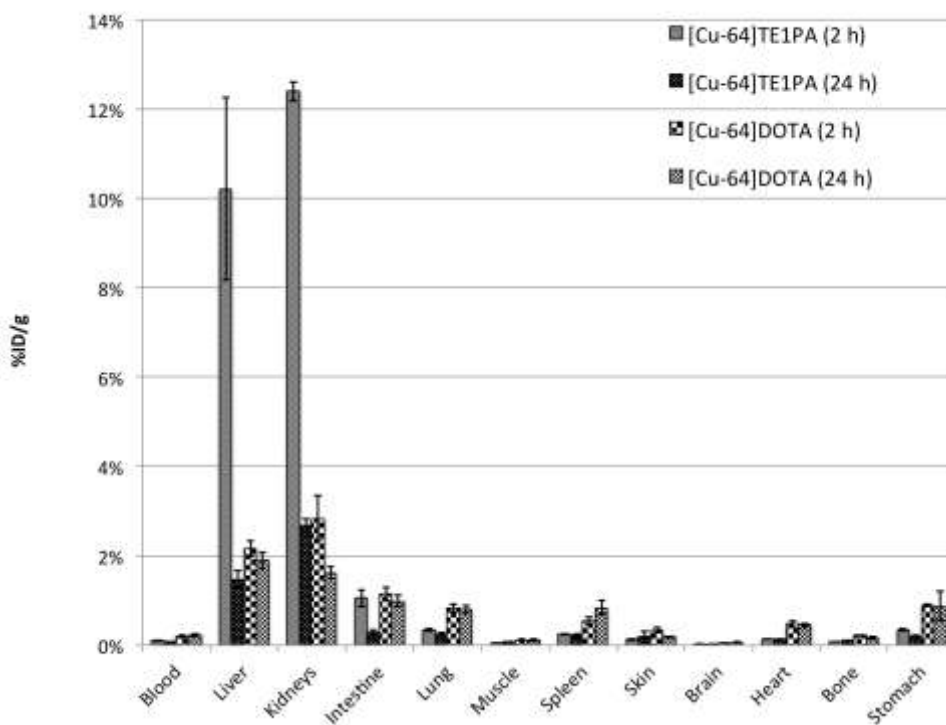
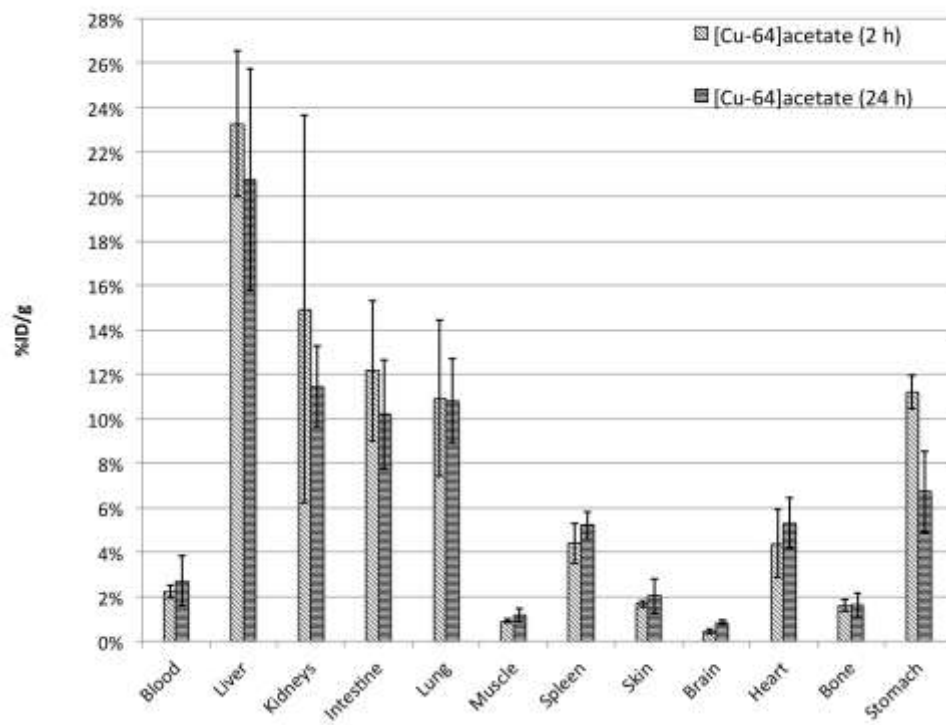


Fig. 6.

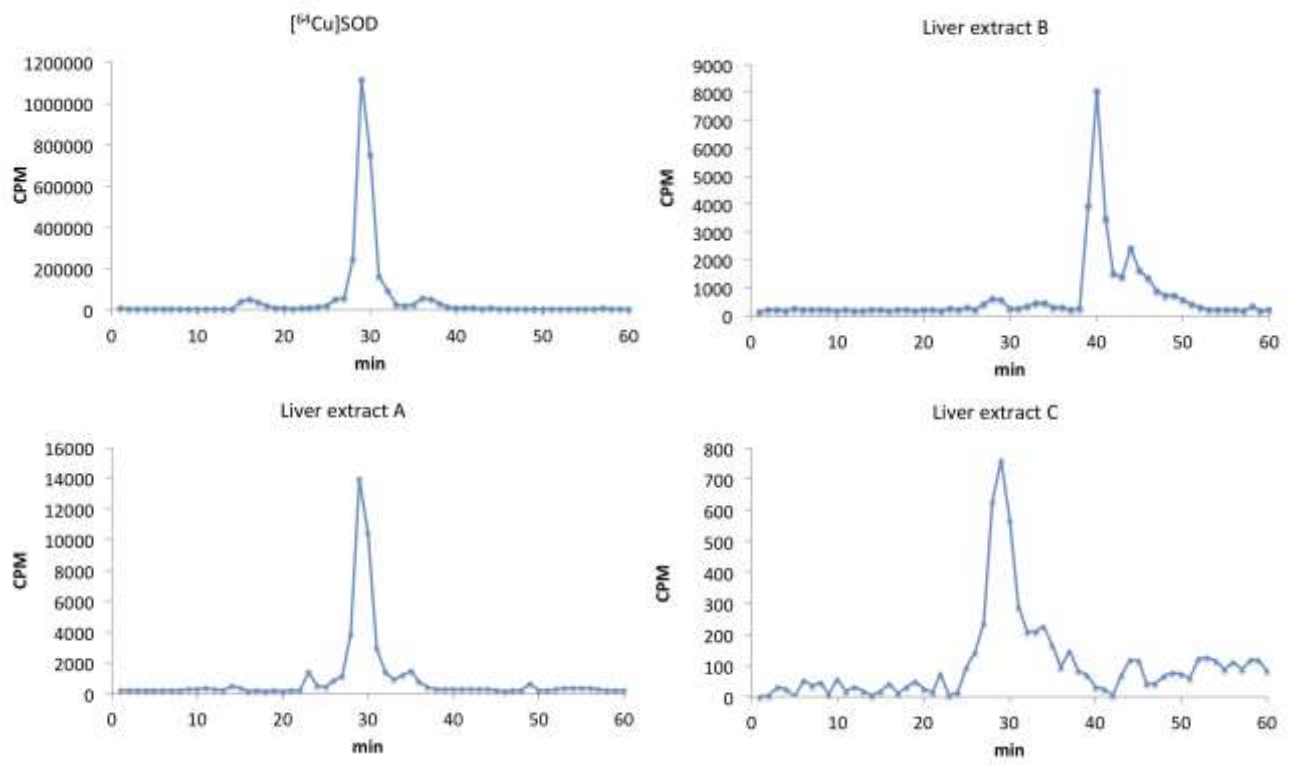


Fig. 7.

# BIBLIOGRAPHIE

1. www.who.int [Internet]. Consulté en octobre 2013
2. ©La situation du cancer en France en 2012. Institut National du Cancer; 2012 Décembre.
3. Barbet J, Chatal J-F, Kraeber-Bodéré F. [Radiolabeled antibodies for cancer treatment]. *Médecine Sci MS*. 2009 Dec;25(12):1039–45.
4. Verel I, Visser GWM, van Dongen GA. The promise of immuno-PET in radioimmunotherapy. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2005 Jan;46 Suppl 1:164S–71S.
5. Phelps ME, Hoffman EJ, Mullani NA, Ter-Pogossian MM. Application of Annihilation Coincidence Detection to Transaxial Reconstruction Tomography. *J Nucl Med*. 1975 Mar 1;16(3):210–24.
6. Kaur S, Venktaraman G, Jain M, Senapati S, Garg PK, Batra SK. Recent trends in antibody-based oncologic imaging. *Cancer Lett*. 2012 Feb 28;315(2):97–111.
7. Bockisch A, Freudenberg LS, Schmidt D, Kuwert T. Hybrid imaging by SPECT/CT and PET/CT: proven outcomes in cancer imaging. *Semin Nucl Med*. 2009 Jul;39(4):276–89.
8. Bredella MA, Steinbach L, Caputo G, Segall G, Hawkins R. Value of FDG PET in the assessment of patients with multiple myeloma. *AJR Am J Roentgenol*. 2005 Apr;184(4):1199–204.
9. Caroli P, Nanni C, Rubello D, Alavi A, Fanti S. Non-FDG PET in the practice of oncology. *Indian J Cancer*. 2010 Jun;47(2):120–5.
10. Delorme S, Baur-Melnyk A. Imaging in multiple myeloma. *Recent Results Cancer Res Fortschritte Krebsforsch Progrès Dans Rech Sur Cancer*. 2011;183:133–47.
11. Kang DE, White RL Jr, Zuger JH, Sasser HC, Teigland CM. Clinical use of fluorodeoxyglucose F 18 positron emission tomography for detection of renal cell carcinoma. *J Urol*. 2004 May;171(5):1806–9.
12. Brink I, Hoegerle S, Klisch J, Bley TA. Imaging of pheochromocytoma and paraganglioma. *Fam Cancer*. 2005;4(1):61–8.
13. Talbot J-N, Gutman F, Huchet V, Kerrou K, Balogova S, Kerrouche N, et al. [Clinical usefulness of positron emission tomography in prostate cancer]. *Presse Médicale Paris Fr* 1983. 2007 Dec;36(12 Pt 2):1794–806.
14. Barwick T, Bencherif B, Mountz JM, Avril N. Molecular PET and PET/CT imaging of tumour cell proliferation using F-18 fluoro-L-thymidine: a comprehensive evaluation. *Nucl Med Commun*. 2009 Dec;30(12):908–17.
15. Dunphy MPS, Lewis JS. Radiopharmaceuticals in Preclinical and Clinical Development for Monitoring of Therapy with PET. *J Nucl Med*. 2009 May 1;50(Suppl 1):106S–121S.

16. Vuillez JP, Levrot E, Mousseau M, Buffaz PD, Bolla M, Payan R, et al. [Evaluation of the diagnostic usefulness of CA125 immunoscintigraphy for ovarian carcinoma follow-up after treatment: contribution of this technique in Grenoble University Medical Center]. *Bull Cancer (Paris)*. 1997 Nov;84(11):1033-42.
17. Hughes K, Pinsky CM, Petrelli NJ, Moffat FL, Patt YZ, Hammershaimb L, et al. Use of carcinoembryonic antigen radioimmunodetection and computed tomography for predicting the resectability of recurrent colorectal cancer. *Ann Surg*. 1997 Nov;226(5):621-31.
18. Pinkas L, Robins PD, Forstrom LA, Mahoney DW, Mullan BP. Clinical experience with radiolabelled monoclonal antibodies in the detection of colorectal and ovarian carcinoma recurrence and review of the literature. *Nucl Med Commun*. 1999;20(8):689-96.
19. Sodee DB, Sodee AE, Bakale G. Synergistic Value of Single-Photon Emission Computed Tomography/Computed Tomography Fusion to Radioimmunoscintigraphic Imaging of Prostate Cancer. *Semin Nucl Med*. 2007 Jan;37(1):17-28.
20. Lamonica D, Czuczman M, Nabi H, Klippenstein D, Grossman Z. Radioimmunoscintigraphy (RIS) with bectumomab (Tc99m labeled IMMU-LL2, Lymphoscan) in the assessment of recurrent non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *Cancer Biother Radiopharm*. 2002 Dec;17(6):689-97.
21. Olafsen T, Wu AM. Antibody vectors for imaging. *Semin Nucl Med*. 2010 May;40(3):167-81.
22. McCabe KE, Wu AM. Positive progress in immunoPET--not just a coincidence. *Cancer Biother Radiopharm*. 2010 Jun;25(3):253-61.
23. [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu) [Internet]. Consulté en octobre 2013
24. [www.theriaque.org](http://www.theriaque.org) [Internet]. Consulté en octobre 2013
25. Libutti SK, Alexander HR Jr, Choyke P, Bartlett DL, Bacharach SL, Whatley M, et al. A prospective study of 2-[18F] fluoro-2-deoxy-D-glucose/positron emission tomography scan, 99mTc-labeled arcitumomab (CEA-scan), and blind second-look laparotomy for detecting colon cancer recurrence in patients with increasing carcinoembryonic antigen levels. *Ann Surg Oncol*. 2001 Dec;8(10):779-86.
26. Willkomm P, Bender H, Bangard M, Decker P, Grünwald F, Biersack HJ. FDG PET and immunoscintigraphy with 99mTc-labeled antibody fragments for detection of the recurrence of colorectal carcinoma. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2000 Oct;41(10):1657-63.
27. Drucker A, Skedgel C, Virik K, Rayson D, Sellon M, Younis T. The cost burden of trastuzumab and bevacizumab therapy for solid tumours in Canada. *Curr Oncol*. 2008 Jun;15(3):136-42.
28. Rougier P, Mitry E. Cancers colorectaux avant et après les biothérapies : une révolution dans la prise en charge des patients ? *Gastroentérologie Clin Biol*. 2009 Aug;33(8-9):672-80.
29. Santinelli A, Pisa E, Stramazotti D, Fabris G. HER-2 status discrepancy between primary breast cancer and metastatic sites. Impact on target therapy. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2008 Mar 1;122(5):999-1004.

30. Van Dongen GAMS, Visser GWM, Lub-de Hooge MN, de Vries EG, Perk LR. Immuno-PET: a navigator in monoclonal antibody development and applications. *Oncologist*. 2007 Dec;12(12):1379–89.
31. Chérel M, Davodeau F, Kraeber-Bodéré F, Chatal JF. Current status and perspectives in alpha radioimmunotherapy. *Q J Nucl Med Mol Imaging Off Publ Ital Assoc Nucl Med AIMN Int Assoc Radiopharm IAR Sect Soc Radiopharm Chem Biol*. 2006 Dec;50(4):322–9.
32. Brouwers AH, Buijs WCAM, Oosterwijk E, Boerman OC, Mala C, Mulder PHMD, et al. Targeting of Metastatic Renal Cell Carcinoma with the Chimeric Monoclonal Antibody G250 Labeled with <sup>131</sup>I or <sup>111</sup>In An Inpatient Comparison. *Clin Cancer Res*. 2003 Sep 1;9(10):3953s–3960s.
33. Wiseman GA, Kornmehl E, Leigh B, Erwin WD, Podoloff DA, Spies S, et al. Radiation Dosimetry Results and Safety Correlations from <sup>90</sup>Y-Ibritumomab Tiuxetan Radioimmunotherapy for Relapsed or Refractory Non-Hodgkin's Lymphoma: Combined Data from 4 Clinical Trials. *J Nucl Med*. 2003 Mar 1;44(3):465–74.
34. Iagaru A, Gambhir SS, Goris ML. <sup>90</sup>Y-ibritumomab therapy in refractory non-Hodgkin's lymphoma: observations from <sup>111</sup>In-ibritumomab pretreatment imaging. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2008 Nov;49(11):1809–12.
35. Pandit-Taskar N, O'Donoghue JA, Morris MJ, Wills EA, Schwartz LH, Gonen M, et al. Antibody mass escalation study in patients with castration-resistant prostate cancer using <sup>111</sup>In-J591: lesion detectability and dosimetric projections for <sup>90</sup>Y radioimmunotherapy. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2008 Jul;49(7):1066–74.
36. Stillebroer AB, Zegers CML, Boerman OC, Oosterwijk E, Mulders PFA, O'Donoghue JA, et al. Dosimetric analysis of <sup>177</sup>Lu-cG250 radioimmunotherapy in renal cell carcinoma patients: correlation with myelotoxicity and pretherapeutic absorbed dose predictions based on <sup>111</sup>In-cG250 imaging. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2012 Jan;53(1):82–9.
37. Forero-Torres A, Shen S, Breitz H, Sims RB, Axworthy DB, Khazaeli MB, et al. Pretargeted radioimmunotherapy (RIT) with a novel anti-TAG-72 fusion protein. *Cancer Biother Radiopharm*. 2005 Aug;20(4):379–90.
38. O'Donnell RT, DeNardo SJ, Yuan A, Shen S, Richman CM, Lara PN, et al. Radioimmunotherapy with (<sup>111</sup>)In/(<sup>90</sup>)Y-2IT-BAD-m170 for metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2001 Jun;7(6):1561–8.
39. Vallabhajosula S, Kuji I, Hamacher KA, Konishi S, Kostakoglu L, Kothari PA, et al. Pharmacokinetics and Biodistribution of <sup>111</sup>In- and <sup>177</sup>Lu-Labeled J591 Antibody Specific for Prostate-Specific Membrane Antigen: Prediction of <sup>90</sup>Y-J591 Radiation Dosimetry Based on <sup>111</sup>In or <sup>177</sup>Lu? *J Nucl Med*. 2005 Apr 1;46(4):634–41.
40. Poli GL, Bianchi C, Virota G, Bettini A, Moretti R, Trachsel E, et al. Radretumab Radioimmunotherapy in Patients with Brain Metastasis: A <sup>124</sup>I-L19SIP Dosimetric PET Study. *Cancer Immunol Res [Internet]*. 2013 May 20 [cited 2013 Aug 3]; Available from: <http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/content/early/2013/05/17/2326-6066.CIR-13-0007>
41. Honda K, Ono M, Shitashige M, Masuda M, Kamita M, Miura N, et al. Proteomic approaches to the discovery of cancer biomarkers for early detection and personalized medicine. *Jpn J Clin Oncol*. 2013 Feb;43(2):103–9.

42. Allard B. Production et caractérisation d'anticorps polyclonaux et monoclonaux ciblant les récepteurs des endothélines en vue d'une immunothérapie des cancers [Thèse]. Université Paris-Sud 11; 2012.
43. Boswell CA, Brechbiel MW. Development of radioimmunotherapeutic and diagnostic antibodies: an inside-out view. *Nucl Med Biol.* 2007 Oct;34(7):757-78.
44. Reddy S, Robinson MK. Immuno-positron emission tomography in cancer models. *Semin Nucl Med.* 2010 May;40(3):182-9.
45. Colcher D, Bird R, Roselli M, Hardman KD, Johnson S, Pope S, et al. In vivo tumor targeting of a recombinant single-chain antigen-binding protein. *J Natl Cancer Inst.* 1990 Jul 18;82(14):1191-7.
46. Pietersz GA, Patrick MR, Chester KA. Preclinical characterization and in vivo imaging studies of an engineered recombinant technetium-99m-labeled metallothionein-containing anti-carcinoembryonic antigen single-chain antibody. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 1998 Jan;39(1):47-56.
47. Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol.* 2005 Sep;23(9):1126-36.
48. Choi CW, Lang L, Lee JT, Webber KO, Yoo TM, Chang HK, et al. Biodistribution of 18F- and 125I-labeled anti-Tac disulfide-stabilized Fv fragments in nude mice with interleukin 2 alpha receptor-positive tumor xenografts. *Cancer Res.* 1995 Nov 15;55(22):5323-9.
49. Yang K, Basu A, Wang M, Chintala R, Hsieh M-C, Liu S, et al. Tailoring structure-function and pharmacokinetic properties of single-chain Fv proteins by site-specific PEGylation. *Protein Eng.* 2003 Oct;16(10):761-70.
50. Yazaki PJ, Kassa T, Cheung C, Crow DM, Sherman MA, Bading JR, et al. Biodistribution and tumor imaging of an anti-CEA single-chain antibody-albumin fusion protein. *Nucl Med Biol.* 2008 Feb;35(2):151-8.
51. Holliger P, Prospero T, Winter G. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jul 15;90(14):6444-8.
52. Sundaresan G, Yazaki PJ, Shively JE, Finn RD, Larson SM, Raubitschek AA, et al. 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 Dec 1;44(12):1962-9.
53. Girgis MD, Kenanova V, Olafsen T, McCabe KE, Wu AM, Tomlinson JS. Anti-CA19-9 diabody as a PET imaging probe for pancreas cancer. *J Surg Res.* 2011 Oct;170(2):169-78.
54. Kelly MP, Lee F-T, Tahtis K, Power BE, Smyth FE, Brechbiel MW, et al. Tumor targeting by a multivalent single-chain Fv (scFv) anti-Lewis Y antibody construct. *Cancer Biother Radiopharm.* 2008 Aug;23(4):411-23.
55. King DJ, Turner A, Farnsworth AP, Adair JR, Owens RJ, Pedley RB, et al. Improved tumor targeting with chemically cross-linked recombinant antibody fragments. *Cancer Res.* 1994 Dec 1;54(23):6176-85.

56. Hu S, Shively L, Raubitschek A, Sherman M, Williams LE, Wong JY, et al. Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Res.* 1996 Jul 1;56(13):3055–61.
57. Leyton JV, Olafsen T, Lepin EJ, Hahm S, Bauer KB, Reiter RE, et al. Humanized radioiodinated minibody for imaging of prostate stem cell antigen-expressing tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2008 Nov 15;14(22):7488–96.
58. Wu AM, Yazaki PJ, Tsai S w, Nguyen K, Anderson AL, McCarthy DW, et al. High-resolution microPET imaging of carcinoembryonic antigen-positive xenografts by using a copper-64-labeled engineered antibody fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jul 18;97(15):8495–500.
59. Slavin-Chiorini DC, Kashmiri SV, Schlom J, Calvo B, Shu LM, Schott ME, et al. Biological properties of chimeric domain-deleted anticarcinoma immunoglobulins. *Cancer Res.* 1995 Dec 1;55(23 Suppl):5957s–5967s.
60. Xu X, Clarke P, Szalai G, Shively JE, Williams LE, Shyr Y, et al. Targeting and therapy of carcinoembryonic antigen-expressing tumors in transgenic mice with an antibody-interleukin 2 fusion protein. *Cancer Res.* 2000 Aug 15;60(16):4475–84.
61. Kim JK, Tsen MF, Ghetie V, Ward ES. Catabolism of the murine IgG1 molecule: evidence that both CH2-CH3 domain interfaces are required for persistence of IgG1 in the circulation of mice. *Scand J Immunol.* 1994 Oct;40(4):457–65.
62. Israel EJ, Wilsker DF, Hayes KC, Schoenfeld D, Simister NE. Increased clearance of IgG in mice that lack beta 2-microglobulin: possible protective role of FcRn. *Immunology.* 1996 Dec;89(4):573–8.
63. Junghans RP, Anderson CL. The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 May 28;93(11):5512–6.
64. Kim JK, Firan M, Radu CG, Kim CH, Ghetie V, Ward ES. Mapping the site on human IgG for binding of the MHC class I-related receptor, FcRn. *Eur J Immunol.* 1999 Sep;29(9):2819–25.
65. Kenanova V, Olafsen T, Crow DM, Sundaresan G, Subbarayan M, Carter NH, et al. Tailoring the pharmacokinetics and positron emission tomography imaging properties of anti-carcinoembryonic antigen single-chain Fv-Fc antibody fragments. *Cancer Res.* 2005 Jan 15;65(2):622–31.
66. Hassanzadeh-Ghassabeh G, Devoogdt N, De Pauw P, Vincke C, Muyldermans S. Nanobodies and their potential applications. *Nanomed.* 2013 Jun;8(6):1013–26.
67. Huang L, Gainkam LOT, Caveliers V, Vanhove C, Keyaerts M, De Baetselier P, et al. SPECT imaging with 99mTc-labeled EGFR-specific nanobody for in vivo monitoring of EGFR expression. *Mol Imaging Biol MIB Off Publ Acad Mol Imaging.* 2008 Jun;10(3):167–75.
68. Vaneycken I, Devoogdt N, Van Gassen N, Vincke C, Xavier C, Wernery U, et al. Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2011 Jul;25(7):2433–46.

69. Ahlgren S, Orlova A, Wällberg H, Hansson M, Sandström M, Lewsley R, et al. Targeting of HER2-expressing tumors using 111In-ABY-025, a second-generation affibody molecule with a fundamentally reengineered scaffold. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2010 Jul;51(7):1131–8.
70. Baum RP, Prasad V, Müller D, Schuchardt C, Orlova A, Wennborg A, et al. Molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors in breast cancer patients using synthetic 111In- or 68Ga-labeled affibody molecules. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2010 Jun;51(6):892–7.
71. Hofström C, Altai M, Honarvar H, Strand J, Malmberg J, Hosseinimehr SJ, et al. HAHAHA, HEHEHE, HIHIHI, or HKHKHK: Influence of Position and Composition of Histidine Containing Tags on Biodistribution of [(99m)Tc(CO)3](+)-Labeled Affibody Molecules. *J Med Chem*. 2013 Jun 27;56(12):4966–74.
72. Mouratou B, Schaeffer F, Guilvout I, Tello-Manigne D, Pugsley AP, Alzari PM, et al. Remodeling a DNA-binding protein as a specific in vivo inhibitor of bacterial secretin PulD. *Proc Natl Acad Sci*. 2007 Nov 13;104(46):17983–8.
73. Krehenbrink M, Chami M, Guilvout I, Alzari PM, Pécorari F, Pugsley AP. Artificial binding proteins (Affitins) as probes for conformational changes in secretin PulD. *J Mol Biol*. 2008 Nov 28;383(5):1058–68.
74. Bennett V, Baines AJ. Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev*. 2001 Jul;81(3):1353–92.
75. Boersma YL, Plückthun A. DARPins and other repeat protein scaffolds: advances in engineering and applications. *Curr Opin Biotechnol*. 2011 Dec;22(6):849–57.
76. Weidle UH, Auer J, Brinkmann U, Georges G, Tiefenthaler G. The Emerging Role of New Protein Scaffold-based Agents for Treatment of Cancer. *Cancer Genomics Proteomics*. 2013 Aug;10(4):155–68.
77. Zahnd C, Kawe M, Stumpp MT, de Pasquale C, Tamaskovic R, Nagy-Davidescu G, et al. Efficient tumor targeting with high-affinity designed ankyrin repeat proteins: effects of affinity and molecular size. *Cancer Res*. 2010 Feb 15;70(4):1595–605.
78. Reilly RM, Maiti PK, Kiarash R, Prashar AK, Fast DG, Entwistle J, et al. Rapid imaging of human melanoma xenografts using an scFv fragment of the human monoclonal antibody H11 labelled with 111In. *Nucl Med Commun*. 2001 May;22(5):587–95.
79. Olafsen T, Sirk SJ, Betting DJ, Kenanova VE, Bauer KB, Ladno W, et al. ImmunoPET imaging of B-cell lymphoma using 124I-anti-CD20 scFv dimers (diabodies). *Protein Eng Des Sel*. 2010 Jan 6;23(4):243–9.
80. Olafsen T, Kenanova VE, Sundaresan G, Anderson A-L, Crow D, Yazaki PJ, et al. Optimizing radiolabeled engineered anti-p185HER2 antibody fragments for in vivo imaging. *Cancer Res*. 2005 Jul 1;65(13):5907–16.
81. Vaneycken I, D’huyvetter M, Hernot S, De Vos J, Xavier C, Devoogdt N, et al. Immuno-imaging using nanobodies. *Curr Opin Biotechnol*. 2011 Dec;22(6):877–81.
82. Steffen A-C, Orlova A, Wikman M, Nilsson FY, Ståhl S, Adams GP, et al. Affibody-mediated tumour targeting of HER-2 expressing xenografts in mice. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2006 Jun;33(6):631–8.



83. Frampas E, Rousseau C, Bodet-Milin C, Barbet J, Chatal J-F, Kraeber-Bodéré F. Improvement of radioimmunotherapy using pretargeting. *Front Oncol.* 2013;3:159.
84. Hnatowich DJ, Virzi F, Rusckowski M. Investigations of avidin and biotin for imaging applications. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 1987 Aug;28(8):1294-302.
85. Knox SJ, Goris ML, Tempero M, Weiden PL, Gentner L, Breitz H, et al. Phase II trial of yttrium-90-DOTA-biotin pretargeted by NR-LU-10 antibody/streptavidin in patients with metastatic colon cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2000 Feb;6(2):406-14.
86. Paganelli G, Orecchia R, Jereczek-Fossa B, Grana C, Cremonesi M, De Braud F, et al. Combined treatment of advanced oropharyngeal cancer with external radiotherapy and three-step radioimmunotherapy. *Eur J Nucl Med.* 1998 Sep;25(9):1336-9.
87. Cremonesi M, Ferrari M, Chinol M, Stabin MG, Grana C, Prisco G, et al. Three-step radioimmunotherapy with yttrium-90 biotin: dosimetry and pharmacokinetics in cancer patients. *Eur J Nucl Med.* 1999 Feb;26(2):110-20.
88. Morandeau L, Benoist E, Loussouarn A, Ouadi A, Lesaec P, Mougin M, et al. Synthesis of new bivalent peptides for applications in the Affinity Enhancement System. *Bioconj Chem.* 2005 Feb;16(1):184-93.
89. Barbet J, Kraeber-Bodéré F, Vuillez JP, Gautherot E, Rouvier E, Chatal JF. Pretargeting with the affinity enhancement system for radioimmunotherapy. *Cancer Biother Radiopharm.* 1999 Jun;14(3):153-66.
90. Barbet J, Peltier P, Bardet S, Vuillez JP, Bachelot I, Denet S, et al. Radioimmunodetection of medullary thyroid carcinoma using indium-111 bivalent hapten and anti-CEA x anti-DTPA-indium bispecific antibody. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 1998 Jul;39(7):1172-8.
91. Vuillez JP, Moro D, Brichon PY, Rouvier E, Brambilla E, Barbet J, et al. Two-step immunoscintigraphy for non-small-cell lung cancer staging using a bispecific anti-CEA/anti-indium-DTPA antibody and an indium-111-labeled DTPA dimer. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 1997 Apr;38(4):507-11.
92. [www.nndc.bnl.gov/nudat2/](http://www.nndc.bnl.gov/nudat2/) [Internet]. Consulté en juillet 2013
93. Philpott GW, Schwarz SW, Anderson CJ, Dehdashti F, Connett JM, Zinn KR, et al. RadioimmunoPET: detection of colorectal carcinoma with positron-emitting copper-64-labeled monoclonal antibody. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 1995 Oct;36(10):1818-24.
94. Bé MM, Chisté V, Dulieu C, Mougéot X, Chechev VP, Kuzmenko NK, et al. Table of radionuclides (Vol. 6-A= 22 to 242). Monogr BIPM-5 Bur Int Poids Mes Sévres Fr [Internet]. 2011 [consulté en juillet 2013]; Disponible à : [http://www1.bipm.org/utis/common/pdf/monographieRI/Monographie\\_BIPM-5\\_Tables\\_Vol6.pdf](http://www1.bipm.org/utis/common/pdf/monographieRI/Monographie_BIPM-5_Tables_Vol6.pdf)
95. Prevodnik VK, Lavren\vcak J, Horvat M, Novakovi\vc BJ. The predictive significance of CD20 expression in B-cell lymphomas. *Diagn Pathol.* 2011;6:33.

96. Kume M, Carey PC, Gaehle G, Madrid E, Voller T, Margenau W, et al. A semi-automated system for the routine production of copper-64. *Appl Radiat Isot Data Instrum Methods Use Agric Ind Med.* 2012 Aug;70(8):1803–6.
97. Obata A, Kasamatsu S, McCarthy DW, Welch MJ, Saji H, Yonekura Y, et al. Production of therapeutic quantities of  $^{64}\text{Cu}$  using a 12 MeV cyclotron. *Nucl Med Biol.* 2003 Jul;30(5):535–9.
98. Thieme S, Walther M, Pietzsch H-J, Henniger J, Preusche S, Mäding P, et al. Module-assisted preparation of  $^{64}\text{Cu}$  with high specific activity. *Appl Radiat Isot Data Instrum Methods Use Agric Ind Med.* 2012 Apr;70(4):602–8.
99. Szelecsenyi F, Blessing G, Qaim S. Excitation-Functions of Proton-Induced Nuclear-Reactions on Enriched Ni-61 and Ni-64 - Possibility of Production of No-Carrier-Added Cu-61 and Cu-64 at a Small Cyclotron. *Appl Radiat Isot.* 1993 Mar;44(3):575–80.
100. McCarthy DW, Shefer RE, Klinkowstein RE, Bass LA, Margeneau WH, Cutler CS, et al. Efficient production of high specific activity  $^{64}\text{Cu}$  using a biomedical cyclotron. *Nucl Med Biol.* 1997 Jan;24(1):35–43.
101. Avila-Rodriguez MA, Nye JA, Nickles RJ. Simultaneous production of high specific activity  $^{64}\text{Cu}$  and  $^{61}\text{Co}$  with 11.4 MeV protons on enriched  $^{64}\text{Ni}$  nuclei. *Appl Radiat Isot Data Instrum Methods Use Agric Ind Med.* 2007 Oct;65(10):1115–20.
102. Aslam MN, Sudar S, Hussain M, Malik AA, Shah HA, Qaim SM. Charged particle induced reaction cross section data for production of the emerging medically important positron emitter Cu-64: A comprehensive evaluation. *Radiochim Acta.* 2009;97(12):669–86.
103. The Elements. Barnes Noble. Consulté en juillet 2013. Disponible à : <http://www.barnesandnoble.com/w/elements-john-emsley/1100545972>
104. Zweit J, Smith AM, Downey S, Sharma HL. Excitation functions for deuteron induced reactions in natural nickel: Production of no-carrier-added  $^{64}\text{Cu}$  from enriched  $^{64}\text{Ni}$  targets for positron emission tomography. *Int J Rad Appl Instrum [A].* 1991;42(2):193–7.
105. Smith SV, Waters DJ, Di Bartolo N. SEPARATION OF  $^{64}\text{Cu}$  FROM  $^{67}\text{Ga}$  WASTE PRODUCTS USING ANION EXCHANGE AND LOW ACID AQUEOUS/ORGANIC MIXTURES. *Radiochim Acta.* 1996;75(2):65–8.
106. Hetherington E, Sorby P, Camakaris J. The Preparation of High Specific Activity Copper-64 for Medical Diagnosis. *Appl Radiat Isot.* 1986;37(12):1242–3.
107. Zinn KR, Chaudhuri TR, Cheng TP, Morris JS, Meyer WA Jr. Production of no-carrier-added  $^{64}\text{Cu}$  from zinc metal irradiated under boron shielding. *Cancer.* 1994 Feb 1;73(3 Suppl):774–8.
108. Haddad F, Ferrer L, Guertin A, Carlier T, Michel N, Barbet J, et al. ARRONAX, a high-energy and high-intensity cyclotron for nuclear medicine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2008 Jul;35(7):1377–87.
109. Linder MC, Wooten L, Cerveza P, Cotton S, Shulze R, Lomeli N. Copper transport. *Am J Clin Nutr.* 1998 May;67(5 Suppl):965S–971S.
110. Peña MMO, Lee J, Thiele DJ. A Delicate Balance: Homeostatic Control of Copper Uptake and Distribution. *J Nutr.* 1999 Jul 1;129(7):1251–60.

111. Laliberté J, Labbé S. [The molecular bases for copper uptake and distribution: lessons from yeast]. *Médecine Sci MS*. 2008 Mar;24(3):277–83.
112. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011 May 10;283(2–3):65–87.
113. Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*. 1999 Apr 30;284(5415):805–8.
114. Nevitt T, Ohrvik H, Thiele DJ. Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Sep;1823(9):1580–93.
115. Kim B-E, Nevitt T, Thiele DJ. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat Chem Biol*. 2008 Mar;4(3):176–85.
116. Prohaska JR, Gybina AA. Intracellular Copper Transport in Mammals. *J Nutr*. 2004 May 1;134(5):1003–6.
117. Kornmann B, Currie E, Collins SR, Schuldiner M, Nunnari J, Weissman JS, et al. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science*. 2009 Jul 24;325(5939):477–81.
118. Cobine PA, Ojeda LD, Rigby KM, Winge DR. Yeast contain a non-proteinaceous pool of copper in the mitochondrial matrix. *J Biol Chem*. 2004 Apr 2;279(14):14447–55.
119. Babula P, Masarik M, Adam V, Eckschlager T, Stiborova M, Trnkova L, et al. Mammalian metallothioneins: properties and functions. *Met Integr Biometal Sci*. 2012 Aug;4(8):739–50.
120. Liu N, Lo LS, Askary SH, Jones L, Kidane TZ, Trang T, et al. Transcuprein is a macroglobulin regulated by copper and iron availability. *J Nutr Biochem*. 2007 Sep;18(9):597–608.
121. Tümer Z. An overview and update of ATP7A mutations leading to Menkes disease and occipital horn syndrome. *Hum Mutat*. 2013 Mar;34(3):417–29.
122. Guide – Affection de Longue Durée - Maladie de Wilson - Protocole National de Diagnostic et de Soins. Haute Autorité de Santé; 2008.
123. Frieden E. Perspectives on copper biochemistry. *Clin Physiol Biochem*. 1986;4(1):11–9.
124. Linder MC, Hazegh-Azam M. Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr*. 1996 May;63(5):797S–811S.
125. Wadas TJ, Wong EH, Weisman GR, Anderson CJ. Copper chelation chemistry and its role in copper radiopharmaceuticals. *Curr Pharm Des*. 2007;13(1):3–16.
126. Rollet N. Etude des propriétés de coordination de nouveaux ligands macrocycliques vis-à-vis de cations métalliques en vue de l'utilisation de leurs complexes pour l'imagerie médicale nucléaire [Thèse]. Université de Bourgogne; 2011.
127. Cabbiness DK, Margerum DW. Macrocyclic effect on the stability of copper(II) tetramine complexes. *J Am Chem Soc*. 1969 Nov;91(23):6540–1.

128. Vértés A, Nagy S, Klencsár Z, Lovas RG, Rösch F. Handbook of Nuclear Chemistry: Vol. 1: Basics of Nuclear Science; Vol. 2: Elements and Isotopes: Formation, Transformation, Distribution; Vol. 3: Chemical Applications of Nuclear Reactions and Radiation; Vol. 4: Radiochemistry and Radiopharmaceutical Chemistry in Life Sciences; Vol. 5: Instrumentation, Separation Techniques, Environmental Issues; Vol. 6: Nuclear Energy Production and Safety Issues. Springer; 2010.
129. Lewis MR, Shively JE. Maleimidocysteineamido-DOTA derivatives: new reagents for radiometal chelate conjugation to antibody sulfhydryl groups undergo pH-dependent cleavage reactions. *Bioconjug Chem.* 1998 Feb;9(1):72–86.
130. Knör S, Modlinger A, Poethko T, Schottelius M, Wester H-J, Kessler H. Synthesis of Novel 1,4,7,10-Tetraazacyclodecane-1,4,7,10-Tetraacetic Acid (DOTA) Derivatives for Chemoselective Attachment to Unprotected Polyfunctionalized Compounds. *Chem – Eur J.* 2007;13(21):6082–90.
131. El Ghachtouli S. Caractérisation, étude thermodynamique et structurale de complexes tétraazamacrocycliques porteurs de groupements pyridine ou pyrazine [Thèse]. Université de Champagne-Ardenne; 2007.
132. Tan YH, Liu M, Nolting B, Go JG, Gervay-Hague J, Liu G. A Nanoengineering Approach for Investigation and Regulation of Protein Immobilization. *ACS Nano.* 2008 Nov 25;2(11):2374–84.
133. Faivre-Chauvet, Chatal JF. Etude de la biodistribution chez la souris axénique de fragments F(ab')<sub>2</sub> de l'anticorps anti-antigène carcino-embryonnaire radiomarqué par l'intermédiaire d'agents chélatants dérivés du CDTA. *Médecine Nucléaire-Imag Fonct Métabolique.* 1996;17–24.
134. Jr D, Mj W. Intracellular metabolism of indium-111-DTPA-labeled receptor targeted proteins. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 1993 Oct;34(10):1728–38.
135. Bass LA, Wang M, Welch MJ, Anderson CJ. In vivo transchelation of copper-64 from TETA-octreotide to superoxide dismutase in rat liver. *Bioconjug Chem.* 2000 Aug;11(4):527–32.
136. Denardo GL, Denardo SJ, Kukis DL, O'Donnell RT, Shen S, Goldstein DS, et al. Maximum tolerated dose of <sup>67</sup>Cu-2IT-BAT-LYM-1 for fractionated radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma: a pilot study. *Anticancer Res.* 1998 Aug;18(4B):2779–88.
137. Jones-Wilson TM, Deal KA, Anderson CJ, McCarthy DW, Kovacs Z, Motekaitis RJ, et al. The in vivo behavior of copper-64-labeled azamacrocyclic complexes. *Nucl Med Biol.* 1998 Aug;25(6):523–30.
138. Woodin KS, Heroux KJ, Boswell CA, Wong EH, Weisman GR, Niu W, et al. Kinetic Inertness and Electrochemical Behavior of Copper(II) Tetraazamacrocyclic Complexes: Possible Implications for in Vivo Stability. *Eur J Inorg Chem.* 2005;2005(23):4829–33.
139. Moi MK, Meares CF, McCall MJ, Cole WC, DeNardo SJ. Copper chelates as probes of biological systems: stable copper complexes with a macrocyclic bifunctional chelating agent. *Anal Biochem.* 1985 Jul;148(1):249–53.
140. Paterson BM, Donnelly PS. Copper complexes of bis(thiosemicarbazones): from chemotherapeutics to diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals. *Chem Soc Rev.* 2011 Apr 18;40(5):3005–18.

141. Cowley AR, Dilworth JR, Donnelly PS, Heslop JM, Ratcliffe SJ. Bifunctional chelators for copper radiopharmaceuticals: the synthesis of [Cu(ATSM)-amino acid] and [Cu(ATSM)-octreotide] conjugates. *Dalton Trans Camb Engl* 2003. 2007 Jan 14;(2):209–17.
142. Juran S, Walther M, Stephan H, Bergmann R, Steinbach J, Kraus W, et al. Hexadentate bispidine derivatives as versatile bifunctional chelate agents for copper(II) radioisotopes. *Bioconjug Chem*. 2009 Feb;20(2):347–59.
143. Zhao R, Planalp RP, Ma R, Greene BT, Jones BT, Brechbiel MW, et al. Role of zinc and iron chelation in apoptosis mediated by tachpyridine, an anti-cancer iron chelator. *Biochem Pharmacol*. 2004 May 1;67(9):1677–88.
144. Torti SV, Torti FM, Whitman SP, Brechbiel MW, Park G, Planalp RP. Tumor Cell Cytotoxicity of a Novel Metal Chelator. *Blood*. 1998 Aug 15;92(4):1384–9.
145. Planalp RP, Przyborowska AM, Park G, Ye N, Lu FH, Rogers RD, et al. Novel cytotoxic chelators that bind iron(II) selectively over zinc(II) under aqueous aerobic conditions. *Biochem Soc Trans*. 2002 Aug;30(4):758–62.
146. Chong H, Torti FM, Torti SV, Brechbiel MW. Synthesis of 1,3,5-cis,cis-triaminocyclohexane N-pyridyl derivatives as potential antitumor agents. *J Org Chem*. 2002 Nov 15;67(23):8072–8.
147. Camphausen K, Sproull M, Tantama S, Venditto V, Sankineni S, Scott T, et al. Evaluation of chelating agents as anti-angiogenic therapy through copper chelation. *Bioorg Med Chem*. 2004 Oct 1;12(19):5133–40.
148. Camphausen K, Sproull M, Tantama S, Sankineni S, Scott T, Ménard C, et al. Evaluation of copper chelation agents as anti-angiogenic therapy. *Bioorg Med Chem*. 2003 Sep 15;11(19):4287–93.
149. Abeysinghe RD, Greene BT, Haynes R, Willingham MC, Turner J, Planalp RP, et al. p53-independent apoptosis mediated by tachpyridine, an anti-cancer iron chelator. *Carcinogenesis*. 2001 Oct;22(10):1607–14.
150. Ma D, Lu F, Overstreet T, Milenic DE, Brechbiel MW. Novel chelating agents for potential clinical applications of copper. *Nucl Med Biol*. 2002 Jan;29(1):91–105.
151. Wadas TJ, Wong EH, Weisman GR, Anderson CJ. Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease. *Chem Rev*. 2010 May 12;110(5):2858–902.
152. Miao Z, Ren G, Liu H, Jiang L, Cheng Z. Small-animal PET imaging of human epidermal growth factor receptor positive tumor with a <sup>64</sup>Cu labeled affibody protein. *Bioconjug Chem*. 2010 May 19;21(5):947–54.
153. Paudyal B, Paudyal P, Oriuchi N, Hanaoka H, Tominaga H, Endo K. Positron emission tomography imaging and biodistribution of vascular endothelial growth factor with <sup>64</sup>Cu-labeled bevacizumab in colorectal cancer xenografts. *Cancer Sci*. 2011 Jan;102(1):117–21.
154. Vavere AL, Butch ER, Dearling JLJ, Packard AB, Navid F, Shulkin BL, et al. <sup>64</sup>Cu-p-NH<sub>2</sub>-Bn-DOTA-hu14.18K322A, a PET radiotracer targeting neuroblastoma and melanoma. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2012 Nov;53(11):1772–8.

155. Wu AM, Yazaki PJ, Tsai S w, Nguyen K, Anderson AL, McCarthy DW, et al. High-resolution microPET imaging of carcinoembryonic antigen-positive xenografts by using a copper-64-labeled engineered antibody fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jul 18;97(15):8495–500.
156. Pfeifer A, Knigge U, Mortensen J, Oturai P, Berthelsen AK, Loft A, et al. Clinical PET of neuroendocrine tumors using <sup>64</sup>Cu-DOTATATE: first-in-humans study. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2012 Aug;53(8):1207–15.
157. Li L, Turatti F, Crow D, Bading JR, Anderson A-L, Poku E, et al. Monodispersed DOTA-PEG-conjugated anti-TAG-72 diabody has low kidney uptake and high tumor-to-blood ratios resulting in improved <sup>64</sup>Cu PET. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2010 Jul;51(7):1139–46.
158. Hoffman TJ, Smith CJ. True radiotracers: Cu-64 targeting vectors based upon bombesin peptide. *Nucl Med Biol*. 2009 Aug;36(6):579–85.
159. Boswell CA, Sun X, Niu W, Weisman GR, Wong EH, Rheingold AL, et al. Comparative in vivo stability of copper-64-labeled cross-bridged and conventional tetraazamacrocyclic complexes. *J Med Chem*. 2004 Mar 11;47(6):1465–74.
160. Philpott GW, Schwarz SW, Anderson CJ, Dehdashti F, Connett JM, Zinn KR, et al. RadioimmunoPET: detection of colorectal carcinoma with positron-emitting copper-64-labeled monoclonal antibody. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 1995 Oct;36(10):1818–24.
161. Lewis MR, Boswell CA, Laforest R, Buettner TL, Ye D, Connett JM, et al. Conjugation of monoclonal antibodies with TETA using activated esters: biological comparison of <sup>64</sup>Cu-TETA-1A3 with <sup>64</sup>Cu-BAT-2IT-1A3. *Cancer Biother Radiopharm*. 2001 Dec;16(6):483–94.
162. Cutler PD, Schwarz SW, Anderson CJ, Connett JM, Welch MJ, Philpott GW, et al. Dosimetry of copper-64-labeled monoclonal antibody 1A3 as determined by PET imaging of the torso. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 1995 Dec;36(12):2363–71.
163. Anderson CJ, Schwarz SW, Connett JM, Cutler PD, Guo LW, Germain CJ, et al. Preparation, biodistribution and dosimetry of copper-64-labeled anti-colorectal carcinoma monoclonal antibody fragments 1A3-F(ab')<sub>2</sub>. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 1995 May;36(5):850–8.
164. Anderson CJ, Dehdashti F, Cutler PD, Schwarz SW, Laforest R, Bass LA, et al. <sup>64</sup>Cu-TETA-octreotide as a PET imaging agent for patients with neuroendocrine tumors. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2001 Feb;42(2):213–21.
165. Prasanphanich AF, Nanda PK, Rold TL, Ma L, Lewis MR, Garrison JC, et al. [<sup>64</sup>Cu-NOTA-8-Aoc-BBN(7-14)NH<sub>2</sub>] targeting vector for positron-emission tomography imaging of gastrin-releasing peptide receptor-expressing tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jul 24;104(30):12462–7.
166. Liu D, Overbey D, Watkinson LD, Smith CJ, Daibes-Figueroa S, Hoffman TJ, et al. Comparative evaluation of three <sup>64</sup>Cu-labeled E. coli heat-stable enterotoxin analogues for PET imaging of colorectal cancer. *Bioconjug Chem*. 2010 Jul 21;21(7):1171–6.

167. Dumont RA, Deininger F, Haubner R, Maecke HR, Weber WA, Fani M. Novel (<sup>64</sup>Cu- and (<sup>68</sup>Ga)-labeled RGD conjugates show improved PET imaging of  $\alpha(v)\beta(3)$  integrin expression and facile radiosynthesis. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2011 Aug;52(8):1276–84.
168. Boswell CA, Sun X, Niu W, Weisman GR, Wong EH, Rheingold AL, et al. Comparative in vivo stability of copper-64-labeled cross-bridged and conventional tetraazamacrocyclic complexes. *J Med Chem*. 2004 Mar 11;47(6):1465–74.
169. Kumar SR, Gallazzi FA, Ferdani R, Anderson CJ, Quinn TP, Deutscher SL. In vitro and in vivo evaluation of <sup>64</sup>Cu-radiolabeled KCCYSL peptides for targeting epidermal growth factor receptor-2 in breast carcinomas. *Cancer Biother Radiopharm*. 2010 Dec;25(6):693–703.
170. Garrison JC, Rold TL, Sieckman GL, Figueroa SD, Volkert WA, Jurisson SS, et al. In vivo evaluation and small-animal PET/CT of a prostate cancer mouse model using <sup>64</sup>Cu bombesin analogs: side-by-side comparison of the CB-TE2A and DOTA chelation systems. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2007 Aug;48(8):1327–37.
171. Wei L, Ye Y, Wadas TJ, Lewis JS, Welch MJ, Achilefu S, et al. (<sup>64</sup>Cu)-labeled CB-TE2A and diamsar-conjugated RGD peptide analogs for targeting angiogenesis: comparison of their biological activity. *Nucl Med Biol*. 2009 Apr;36(3):277–85.
172. Sprague JE, Peng Y, Sun X, Weisman GR, Wong EH, Achilefu S, et al. Preparation and biological evaluation of copper-64-labeled tyr<sup>3</sup>-octreotate using a cross-bridged macrocyclic chelator. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2004 Dec 15;10(24):8674–82.
173. Sprague JE, Peng Y, Fiamengo AL, Woodin KS, Southwick EA, Weisman GR, et al. Synthesis, characterization and in vivo studies of Cu(II)-64-labeled cross-bridged tetraazamacrocyclic-amide complexes as models of peptide conjugate imaging agents. *J Med Chem*. 2007 May 17;50(10):2527–35.
174. Lewis EA, Boyle RW, Archibald SJ. Ultrastable complexes for in vivo use: a bifunctional chelator incorporating a cross-bridged macrocycle. *Chem Commun Camb Engl*. 2004 Oct 7;(19):2212–3.
175. Liu W, Hao G, Long MA, Anthony T, Hsieh J-T, Sun X. Imparting multivalency to a bifunctional chelator: a scaffold design for targeted PET imaging probes. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2009;48(40):7346–9.
176. Boswell CA, Regino CAS, Baidoo KE, Wong KJ, Bumb A, Xu H, et al. Synthesis of a cross-bridged cyclam derivative for peptide conjugation and <sup>64</sup>Cu radiolabeling. *Bioconjug Chem*. 2008 Jul;19(7):1476–84.
177. Sargeson AM. The potential for the cage complexes in biology. *Coord Chem Rev*. 1996 Jun;151:89–114.
178. Di Bartolo N, Sargeson AM, Smith SV. New <sup>64</sup>Cu PET imaging agents for personalised medicine and drug development using the hexa-aza cage, SarAr. *Org Biomol Chem*. 2006 Sep 7;4(17):3350–7.
179. Bartolo NMD, Sargeson AM, Donlevy TM, Smith SV. Synthesis of a new cage ligand, SarAr, and its complexation with selected transition metal ions for potential use in radioimaging. *J Chem Soc Dalton Trans*. 2001 Jan 1;(15):2303–9.

180. Liu S, Li Z, Yap L-P, Huang C-W, Park R, Conti PS. Efficient preparation and biological evaluation of a novel multivalency bifunctional chelator for  $^{64}\text{Cu}$  radiopharmaceuticals. *Chem Weinh Bergstr Ger*. 2011 Sep 5;17(37):10222–5.
181. <http://clinicaltrials.gov/> [Internet]. Consulté en octobre 2013
182. Suzuki K, Yasuda M, Yamasaki K. Stability Constants of Picolinic and Quinaldic Acid Chelates of Bivalent Metals. *J Phys Chem*. 1957 Feb 1;61(2):229–31.
183. Chromium picolinate, zinc picolinate and zinc picolinate dihydrate added for nutritional purposes in food supplements. *EFSA J*. 2009;
184. Pálinkás Z, Roca-Sabio A, Mato-Iglesias M, Esteban-Gómez D, Platas-Iglesias C, de Blas A, et al. Stability, water exchange, and anion binding studies on lanthanide(III) complexes with a macrocyclic ligand based on 1,7-diaza-12-crown-4: extremely fast water exchange on the  $\text{Gd}^{3+}$  complex. *Inorg Chem*. 2009 Sep 21;48(18):8878–89.
185. Boros E, Lin Y-HS, Ferreira CL, Patrick BO, Häfeli UO, Adam MJ, et al. One to chelate them all: investigation of a versatile, bifunctional chelator for  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , Re and Co. *Dalton Trans*. 2011 May 31;40(23):6253–9.
186. Lima LMP, Esteban-Gómez D, Delgado R, Platas-Iglesias C, Tripiet R. Monopicolinate cyclen and cyclam derivatives for stable copper(II) complexation. *Inorg Chem*. 2012 Jun 18;51(12):6916–27.
187. Roger M, Lima LMP, Frindel M, Platas-Iglesias C, Gustin J-F, Delgado R, et al. Monopicolinate-dipicolyl derivative of triazacyclononane for stable complexation of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $^{64}\text{Cu}^{2+}$ . *Inorg Chem*. 2013 May 6;52(9):5246–59.
188. Smith SV. Sarar technology for the application of Copper-64 in biology and materials science. *Q J Nucl Med Mol Imaging Off Publ Ital Assoc Nucl Med AIMN Int Assoc Radiopharm IAR Sect Soc Radiopharm Chem Biol*. 2008 Jun;52(2):193–202.
189. Smith SV. Molecular imaging with copper-64. *J Inorg Biochem*. 2004 Nov;98(11):1874–901.
190. Cai H, Li Z, Huang C-W, Park R, Shahinian AH, Conti PS. An improved synthesis and biological evaluation of a new cage-like bifunctional chelator, 4-((8-amino-3,6,10,13,16,19-hexaazabicyclo[6.6.6]icosane-1-ylamino)methyl)benzoic acid, for  $^{64}\text{Cu}$  radiopharmaceuticals. *Nucl Med Biol*. 2010 Jan;37(1):57–65.
191. Sun X, Wuest M, Weisman GR, Wong EH, Reed DP, Boswell CA, et al. Radiolabeling and in vivo behavior of copper-64-labeled cross-bridged cyclam ligands. *J Med Chem*. 2002 Jan 17;45(2):469–77.
192. Anderson CJ, Wadas TJ, Wong EH, Weisman GR. Cross-bridged macrocyclic chelators for stable complexation of copper radionuclides for PET imaging. *Q J Nucl Med Mol Imaging Off Publ Ital Assoc Nucl Med AIMN Int Assoc Radiopharm IAR Sect Soc Radiopharm Chem Biol*. 2008 Jun;52(2):185–92.
193. Alici E, Konstantinidis KV, Aints A, Dilber MS, Abedi-Valugerdi M. Visualization of 5T33 myeloma cells in the C57BL/KaLwRij mouse: establishment of a new syngeneic murine model of multiple myeloma. *Exp Hematol*. 2004 Nov;32(11):1064–72.



194. Vanderkerken K, De Raeve H, Goes E, Van Meirvenne S, Radl J, Van Riet I, et al. Organ involvement and phenotypic adhesion profile of 5T2 and 5T33 myeloma cells in the C57BL/KaLwRij mouse. *Br J Cancer*. 1997;76(4):451-60.

**Nom - Prénom :** FRINDEL Mathieu

**Titre du mémoire-thèse :** Développement de nouveaux ligands pour l'imagerie phénotypique-TEP au cuivre-64 en cancérologie

---

**Résumé du mémoire-thèse :**

Les techniques d'imagerie médicale morphologiques et métaboliques, utilisées pour le diagnostic ou la stadification en cancérologie, peuvent être peu contributives dans certains types de cancers.

L'imagerie phénotypique-TEP est une modalité tierce basée sur le ciblage spécifique d'un biomarqueur tumoral ainsi que sur la tomographie par émission de positons. L'intérêt de cette modalité d'imagerie réside dans l'amélioration de la sensibilité et la spécificité diagnostique dans ces cancers difficiles à imager, ainsi que dans sa capacité à sélectionner les patients éligibles à une thérapie ciblée de même qu'à évaluer la réponse à ce type de traitements. Le radiopharmaceutique administré consiste en un vecteur, de type anticorps monoclonal, marqué avec un radionucléide émetteur de positons, dont l'un des mieux adaptés actuellement est le cuivre-64. La problématique majeure des marquages au cuivre-64 est leur manque de stabilité *in vivo*. Les ligands macrocycliques bifonctionnels, mis à profit comme intermédiaires pour coupler le cuivre-64 au vecteur, forment en effet des complexes pouvant se dissocier *in vivo*, sous l'action de compétiteurs métalliques ou de certaines protéines physiologiques.

Le développement de l'imagerie phénotypique-TEP au cuivre-64 repose donc en partie sur le design et l'évaluation de nouveaux ligands, à même de former des complexes plus inertes après leur administration chez l'homme.

Ce travail présente le radiomarquage du cyclam monopicolinate (TE1PA) ainsi que les études réalisées *in vitro* et *in vivo* (chez la souris) ayant permis de montrer les propriétés très encourageantes de ce ligand pour de futures applications d'imagerie phénotypique.

---

**MOTS CLÉS :** CANCÉROLOGIE, CUIVRE-64, IMAGERIE MÉDICALE, LIGANDS MACROCYCLIQUES, RADIOPHARMACEUTIQUES, TOMOGRAPHIE PAR ÉMISSION DE POSITONS

---

**JURY**

**PRÉSIDENT :** M. Alain FAIVRE-CHAUVET, Professeur de Biophysique et Praticien Hospitalier - NANTES

**ASSESEURS :** M. Mickaël BOURGEOIS, Maître de Conférences de Biophysique et Praticien Hospitalier - NANTES  
M. Frank BOURY, Professeur de Biophysique - ANGERS  
M. Franck LACOEUILLE, Maître de Conférences de Biophysique et Médecine Nucléaire-Praticien Hospitalier - ANGERS  
M. Raphaël TRIPIER, Professeur de Chimie-BREST

---

**Adresse de l'auteur :-** 44200 NANTES