

ANNÉE 2020

N°

**MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
PHARMACIE HOSPITALIÈRE ET DES
COLLECTIVITÉS**

Soutenu devant le jury interrégional

Le Lundi 05 Octobre 2020

Par **Constance DUBÉGNY**

Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février

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

***[68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor : un nouveau
radiopharmaceutique pour la TEP***

Président du jury : **Mickaël BOURGEOIS**, Maitre de conférences - Praticien hospitalier, CHU de Nantes

Directeur du jury : **Alain FAIVRE-CHAUVET**, Professeur des universités - Praticien hospitalier, CHU de Nantes

Membres du jury : **Franck LACOEUILLE**, Maitre de conférences - Praticien hospitalier, CHU d'Angers

Mathieu FRINDEL – Dr en Pharmacie, Centre de cancérologie de l'Ouest

Cécile BOURDEAU – Dr en Pharmacie, Centre de recherche ARRONAX

Remerciements

À **Monsieur Mickaël BOURGEOIS**, merci de me faire l'honneur de présider un jury de thèse pour la première fois et de bien vouloir juger mon travail.

À **Monsieur Franck LACOEUILLE**, pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Veuillez recevoir l'expression de tout mon respect.

À **Monsieur Mathieu FRINDEL**, je te remercie d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et de m'avoir suggéré ce sujet. Merci de m'avoir accompagné lors de ce travail, pour l'accueil à l'ICO, pour ta disponibilité et ton aide précieuse.

À **Madame Cécile BOURDEAU**, je te remercie de faire partie de ce jury et de juger ce travail.

À **Monsieur Alain FAIVRE-CHAUVET**, de me faire l'honneur de diriger cette thèse mais aussi de m'avoir guidé et enseigné le métier de radiopharmacien. Je suis très fière de compter parmi vos internes et de rejoindre le clan des Radiopharmaciens. Merci, Alain, pour vos conseils, votre patience et votre bonne humeur au cours de ces deux années d'internat.

Je tiens à remercier Aurore Rauscher et Pierre Baumgartner pour leur collaboration lors de ce travail.

À **mes collègues de radiopharmacie et de médecine nucléaire** avec qui j'ai eu plaisir à travailler pendant ces deux années. Merci à Marie Degraef pour sa confiance et sa sympathie et bien évidemment merci à Brigitte Lebrun pour ses conseils, son expérience et son amitié.

À **mes co-internes** rencontrés durant ces cinq années : Lucie, Justine, Anne, Maëva, Laura, Pauline, Morgane, Fabien, aux co-internes Bretons et particulièrement à la pharma cœur : Pascaline, Apolline et Dorine.

Aux pharmaciens des différentes PUI qui m'ont accompagné durant cet internat : Christelle, Nicolas S, Julie, Maud, Pierre-Nicolas et les pharmaciens du CHU de Nantes.

À tous mes copains de la faculté Caennaise, Caro, Eléa, Florent, Josie, Nicolas, Rosy, Pierre-Ju, Agnès, Xavier et aux autres ... pour tous ces bons moments !

À mes parents, merci pour votre soutien et votre présence aujourd'hui comme au quotidien.

Et à mon Valentin, merci d'être qui tu es.

Table des matières

Remerciements	2
Liste des tableaux.....	8
Liste des figures.....	9
Liste des annexes	11
Abréviations.....	12
Introduction.....	15
Partie I : Revue Bibliographique	17
I. LA TOMOGRAPHIE PAR EMISSION DE POSITONS.....	18
<i>I.1. Principe de la TEP.....</i>	<i>18</i>
a) L'émission du positon	18
b) Le principe de détection	19
<i>I.2. Quels radionucléides pour la TEP ?.....</i>	<i>21</i>
a) Le choix du radionucléide.....	21
b) Les radionucléides utilisables en TEP.....	24
c) Les méthodes de radiomarquage.....	25
<i>I.3. La TEP-métabolique.....</i>	<i>26</i>
a) Définition et utilisation en oncologie.....	26
b) Description du traceur le plus utilisé en TEP métabolique : [18F]-FluoroDesoxyGlucose.....	27
c) Intérêts et limites d'utilisation de la TEP au FDG.....	28
<i>I.4. La TEP-Phénotypique.....</i>	<i>30</i>
a) Définition et utilisation en oncologie.....	30
b) Le récepteur de chimiokine CXCR4	32
c) Les antagonistes du CXCR4 en TEP.....	33
d) Le DOTA-Pentixafor	33
II. LE GALLIUM-68.....	35
<i>II.1. Propriétés chimiques du Gallium-68.....</i>	<i>35</i>
<i>II.2 Propriétés physiques du Gallium-68.....</i>	<i>37</i>
<i>II.3 Mode de production du Gallium-68.....</i>	<i>39</i>
a) Le principe de fonctionnement d'un générateur.....	39
b) Le générateur de Germanium-68/Gallium-68	41

c) Mode de production du Germanium-68.....	43
II.4. L'intérêt porté au Gallium-68	45
III. LE DOSSIER DU MEDICAMENT EXPÉRIMENTAL.....	46
III.1. La recherche impliquant la personne humaine	46
a) La législation des essais cliniques.....	46
b) Les différentes phases d'un essai clinique	47
c) La demande d'autorisation d'essai clinique.....	50
III.2. Essai clinique et médicament radiopharmaceutique.....	51
a) La législation des médicaments radiopharmaceutiques.....	51
b) Les médicaments radiopharmaceutiques expérimentaux.....	51
III.3. Qu'est-ce que le dossier du médicament expérimental ?.....	53
III.4. Les données relatives à la qualité pharmaceutique, chimique et biologique : partie 1 du DME.....	53
a) Les substances actives ou ingrédients actifs (API)	54
b) Le produit fini	55
Partie II : Développement du [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor.....	57
I. Présentation.....	58
II. Matériel pour le radiomarquage.....	58
II.1. Matériels et réactifs de synthèse :.....	58
a) Le peptide	58
b) Le générateur de Germanium-68/Gallium-68	58
c) L'automate de synthèse, les consommables et réactifs	59
II.2. Matériels et réactifs de contrôle.....	61
a) Analyses chromatographiques	61
b) Détermination de la pureté radionucléidique	62
c) Détermination du pH.....	62
d) Détermination des endotoxines.....	63
III. Méthode.....	63
III.1. La synthèse du [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor	63
a) Les étapes de synthèse.....	63
b) Contrôle des étapes de synthèse	66
III.2. Contrôles du produit fini	67
a) Identification du [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor et détermination de la pureté radiochimique par méthode HPLC	67
b) Validation de la méthode analytique HPLC.....	67

c)	Détermination de la pureté radiochimique par méthode CCM.....	68
d)	Détermination du pH.....	69
e)	Détermination des endotoxines.....	69
f)	Identification radionucléidique du Gallium-68.....	69
g)	Détermination de la pureté radionucléidique	70
h)	Stérilité	70
i)	Détermination de la concentration en éthanol	70
III.3.	<i>Étude de stabilité</i>	70
IV.	Résultats	71
IV.1.	<i>Synthèse</i>	71
a)	Le [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor	71
b)	Contrôles des étapes de synthèse.....	71
IV.2.	<i>Validation de la méthode analytique HPLC :</i>	72
a)	Répétabilité	72
b)	Spécificité	72
c)	Linéarité.....	74
d)	Limite de détection	76
IV.3.	<i>Contrôles du produit fini</i>	77
a)	Identification du [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor et détermination de la pureté radiochimique par méthode HPLC	77
b)	Détermination de la pureté radiochimique par méthode CCM.....	78
c)	Détermination du pH.....	78
d)	Détermination des endotoxines.....	78
e)	Identification radionucléidique du [68Ga]	79
f)	Détermination de la pureté radionucléidique	79
g)	Stérilité	79
h)	Détermination de la concentration en éthanol	79
IV.4.	<i>Étude de stabilité</i>	80
V.	Discussion	81
V.1.	<i>Choix des conditions de marquage</i>	81
a)	Le pH et le tampon	81
b)	La température.....	83
c)	La pré-purification	84
V.2.	<i>La validation de la méthode HPLC</i>	86
V.3.	<i>Les contrôles du produit fini</i>	87
a)	HPLC.....	87

b) CCM	88
c) Les contrôles pour la routine clinique	88
VI. Conclusion.....	90
Bibliographie.....	91
Annexes.....	100

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux émetteurs β^+ utilisables en TEP	24
Tableau 2 : Exemple de sensibilité et spécificité de la TEP par type de cancers	26
Tableau 3 : Autres radiopharmaceutiques traceurs de la TEP.....	30
Tableau 4 : Exemples d'agents phénotypiques au stade de recherche clinique	32
Tableau 5 : Tableau regroupant des recherches en cours sur le DOTA-Pentixafor.....	34
Tableau 6 : Caractéristiques des principaux ligands du Gallium.....	36
Tableau 7 : Principaux rayonnements et émissions du Gallium-68.....	39
Tableau 8 : Ensemble des générateurs disponibles	40
Tableau 9 : Caractéristiques des générateurs de $[^{68}\text{Ge}]/[^{68}\text{Ga}]$ sur le marché français.....	41
Tableau 10 : Caractéristiques de l'éluat de $[^{68}\text{Ga}]$ Gallium selon la pharmacopée européenne (69)	42
Tableau 11 : Principales réactions nucléaires produisant du $[^{68}\text{Ge}]$ -Germanium	44
Tableau 12 : Paramètres de production du $[^{68}\text{Ge}]$ -Germanium des différents cyclotrons	45
Tableau 13 : Ensemble des procédures à formuler pour un essai clinique en radiopharmacie	52
Tableau 14 : Programme du gradient des solvants HPLC	61
Tableau 15 : Résultats de la synthèse du $[^{68}\text{Ga}]$ -DOTA-Pentixafor.....	71
Tableau 16 : Temps de rétention obtenus pour la spécificité de la méthode HPLC.....	73
Tableau 17 : Résultats des lots de validation par la méthode HPLC.....	77
Tableau 18 : Résultats de la PRC des lots de validation par CCM.....	78
Tableau 19 : Résultats du taux d'endotoxines pour les lots de validation	79
Tableau 20 : Résultats de l'identification radionucléidique du $[^{68}\text{Ga}]$	79
Tableau 21 : Résultats de l'étude de stabilité	80
Tableau 22 : Méthodes de pré-purification de l'éluat de $[^{68}\text{Ga}]$	85

Liste des figures

Figure 1 : Équation de la désintégration β^+	18
Figure 2 : Représentation de l'annihilation du positon (2)	19
Figure 3 : Représentation schématique de la détection en coïncidence des photons.....	20
Figure 4 : Schéma des différentes coïncidences parasites rencontrées en TEP (2).....	21
Figure 5 : Représentation schématique du glucose et de [18F]-FDG	27
Figure 6 : Métabolisme du glucose et du [18F]-FDG.....	27
Figure 7 : Schéma représentant le métabolisme du FDG dans une cellule saine (à gauche) et une cellule tumorale (à droite)	28
Figure 8 : Représentation chimique du DOTA-Pentixafor.....	34
Figure 9 : Désintégration beta + du [68Ga]-Gallium	37
Figure 10 : Capture électronique du [68Ga]-Gallium.....	37
Figure 11 : Représentation schématique de la désintégration du [68Ga] (59)	38
Figure 12 : Profil d'élution d'un générateur Ge/Ga (70)	43
Figure 13 : Différentes catégories d'une recherche sur la personne humaine (source Inserm)	47
Figure 14 : Photographie d'une cassette de synthèse	59
Figure 15 : Illustration d'un kit de réactifs	60
Figure 16 : Préparation du flacon de tampon acétate	60
Figure 17 : Graphique du gradient des solvants HPLC.....	62
Figure 18 : Montage de la cassette et connexion sur l'automate de synthèse	64
Figure 19 : Graphique représentant le test d'intégrité du filtre	71
Figure 20 : Graphique représentant un relevé de température dans le réacteur lors d'un marquage	72

Figure 21 : Chromatogrammes UV de la solution de référence de DOTA-Pentixafor.....	73
Figure 22 : Radiochromatogrammes du mélange [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor et [68Ga] libre	74
Figure 23 : Représentation graphique de la linéarité du détecteur UV.....	75
Figure 24 : Représentation graphique de la linéarité du radiodétecteur	75
Figure 25 : Influence du pH sur la réaction de marquage du [68Ga]-DOTA (92).....	81
Figure 26 : Représentation du complexe [68Ga]-DOTA.....	82
Figure 27 : Influence de la température sur le radiomarquage du Ga-DOTATOC à pH 3,5-4 (92)	84
Figure 28 : Conditions de contrôle HPLC du Ga-Edotreotide issues de la pharmacopée (96).	87

Liste des annexes

Annexe 1 : Tableau des différents antagonistes TEP du CXCR4 en voie de développement	100
Annexe 2 : Contenu du dossier du médicament expérimental	101
Annexe 3 : Étapes de synthèse du [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor.....	103
Annexe 4 : Récapitulatif des contrôles qualité de la solution de [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor	104
Annexe 5 : Chromatogrammes HPLC du lot 1 obtenus par le détecteur UV (graphe 1) et radiodétecteur (graphe 2).....	105
Annexe 6 : Radiochromatogrammes du lot 1 obtenus par CCM avec le mélange ammonium / méthanol (graphe 1) et le citrate (graphe 2)	106

Abréviations

[18F]-FDG	2-Désoxy-2-[18F]-Fluoro-D-Glucose ou [18F]-FluoroDésoxyGlucose
[68Ga]	[68Ga]-Gallium
[68Ge]	[68Ge]-Germanium
[68Zn]	Zinc-68
β^+	Béta plus
β^-	Béta moins
CE	Capture Électronique
e^+	Positron
e^-	Électron
γ	Gamma
ν	Neutrino
ACN	Acétonitrile
AEC	Autorisation d'Essai Clinique
AMB	Acide AminéthylBenzoïque
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
ARS	Agence Régionale de Santé
AS	Activité Spécifique
ASN	Autorité de Sûreté Nucléaire
ATU	Autorisation Temporaire d'Utilisation
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CPM	Coups Par Minute
CPP	Comité de Protection des Personnes
CSP	Code de la Santé Publique

CXCL12	C-X-C Chemokine ligand 12
CXCR4	C-X-C Chemokine Receptor type 4
DME	Dossier du Médicament Expérimental
Eau PPI	Eau Pour Préparation Injectable
FDG	FluoroDésoxyGlucose
FDG-6P	FluoroDésoxyGlucose-6-Phosphate
GLUT	Transporteur membranaire du glucose
HCl	Acide Chlorhydrique
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
IRCNA	Institut Régional du Cancer Nantes Atlantique
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IRSN	Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire
KeV	KiloÉlectron Volt
LAL	Lysat d'Amoebocyte de Limule
LOR	Ligne Of Response
ME	Médicament Expérimental
MRP	Médicament RadioPharmaceutique
MRPE	Médicament RadioPharmaceutique Expérimental
n	Neutron
p	Proton
Ph. Eur.	Pharmacopée Européenne
PM	PhotoMultiplificateur
PRC	Pureté RadioChimique
PRN	Pureté RadioNucléidique
PSMA	Antigène Spécifique Membranaire de la Prostate
PUI	Pharmacie à Usage Intérieur

RCP	Résumé des caractéristiques du produit
R²	Coefficient de corrélation
RIPH	Recherche Impliquant la Personne Humaine
SNC	Système Nerveux Central
SPECT	Single Photon Emission Computed tomography
TDM	TomoDensitoMétrie
TEMP	Tomographie par Émission MonoPhotonique
TEP	Tomographie par Émission de Positron
TFA	Acide TriFluoroacétique
TNE	Tumeur NeuroEndocrine
Tr	Temps de Rétention
Tr_{ref}	Temps de Rétention de la Référence

Introduction

La radiopharmacie est un domaine de la pharmacie relatif aux médicaments radioactifs ou médicaments radiopharmaceutiques (MRP). De façon plus large, la radiopharmacie est en charge de la réception, du stockage, de la fabrication, des contrôles, de la délivrance et de la gestion des produits de santé du domaine qui inclus non seulement les radiopharmaceutiques, mais aussi les générateurs, trousseaux et précurseurs. Ces missions sont soumises à une autorisation spécifique optionnelle des agences régionales de santé (ARS) et placées sous la responsabilité d'un radiopharmacien qui a délégué de sa responsabilité de la part du gérant de la pharmacie à usage intérieur (PUI). Une des caractéristiques des MRP concerne la péremption courte de ces produits qui impose leur fabrication in situ dans le respect des bonnes pratiques. Un des rôles du radiopharmacien est de développer de nouveaux MRP et de rendre possible leur fabrication au sein de la radiopharmacie du service.

Depuis quelques années, la tomographie par émission de positons (TEP) occupe une place majeure dans l'activité de la médecine nucléaire. Les MRP-TEP se sont principalement développés avec le [18F]-Fluor mais d'autres radionucléides sont utilisables en TEP. C'est le cas du [68Ga]-Gallium ([68Ga]), premier radionucléide utilisé en TEP et produit par un générateur avec une autorisation de mise sur le marché (AMM). Le premier MRP radiomarqué au [68Ga] commercialisé est le Somakit®, ciblant les récepteurs de la somatostatine dans le diagnostic des tumeurs neuroendocrines. Le deuxième, utilisé dans le cadre d'une autorisation temporaire d'utilisation (ATU), est un ligand des récepteurs du PSMA marqué au gallium-68 dans le cancer de la prostate. Mais une autre cible fait l'objet de recherche en oncologie, il s'agit du récepteur du CXCR4 impliqué dans le développement de nombreux cancers (foie, poumon, moelle osseuse). Pour cibler ce récepteur, plusieurs peptides ont été développés dont notamment un pentapeptide cyclique inhibiteur des récepteurs aux chimiokines de type 4 : le Pentixafor. Marqué au [68Ga], le Pentixafor serait un outil de diagnostic d'intérêt en oncologie, car non seulement les récepteurs aux chimiokines sont surexprimés dans plusieurs types de cancers et sont aussi impliqués dans les phénomènes de dissémination tumorale.

Dans le cadre du développement de ce MRP, la radiopharmacie de l'IRCNA a travaillé, en collaboration avec la société Pentixapharm, afin de mettre au point le radiomarquage du

Pentixafor au [68Ga]-Gallium ainsi que réaliser des lots de validation de la synthèse. Elle a également participé à la rédaction du dossier du médicament expérimental (DME) nécessaire pour obtenir l'avis favorable des autorités compétentes afin de démarrer un essai clinique.

L'objectif de ce mémoire est donc le développement d'un nouveau médicament radiopharmaceutique, le [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor, en vue de son utilisation dans le cadre d'un essai clinique. La première partie du mémoire est une revue bibliographique portant sur la TEP et ses caractéristiques ; sur les propriétés du [68Ga] et enfin sur les généralités des essais cliniques et du DME. La deuxième partie exposera les travaux réalisés pour le développement et la mise au point du radiomarquage du Pentixafor au [68Ga]-Gallium.

Partie I : Revue Bibliographique

I. LA TOMOGRAPHIE PAR EMISSION DE POSITONS

La TEP est une technique d'imagerie fonctionnelle non invasive permettant d'étudier la distribution dynamique in vivo d'un radiotracer administré dans l'organisme. Elle reflète le métabolisme, la vascularisation ou encore la présence de récepteurs spécifiques au sein d'un organe cible, de façon complémentaire aux techniques morphologiques (scanner, IRM), qui elles permettent d'obtenir une image de l'anatomie des organes. Le fonctionnement de la TEP repose sur la détection de rayonnements ionisants par une caméra composée de détecteurs en couronne sur un support appelé statif. Le patient après injection du MRP, est placé sur un lit qui va se déplacer au centre des détecteurs. Les rayonnements de 511 KeV émis à partir du patient permettent d'obtenir des images reconstruites par ordinateur ou tomographie.

L'arrivée de la TEP en médecine nucléaire a permis d'améliorer la qualité des images puisque cette technique est 10 fois plus sensible que la tomographie par émission monophotonique (TEMP) avec une meilleure résolution (2-3 mm vs 5 mm). Cette technique d'imagerie est maintenant toujours couplée à une imagerie morphologique, la tomodensitométrie aux rayons X (TDM), permettant en même temps d'obtenir des informations sur la fonctionnalité et l'anatomie des organes. L'association de ces deux types d'imagerie permet après reconstruction la fusion des images pour un meilleur repérage anatomique (1).

I.1. Principe de la TEP

a) L'émission du positon

La réalisation d'un examen TEP nécessite l'administration d'un radiopharmaceutique, émetteur bêta + (β^+). Les noyaux des atomes émetteurs β^+ présentent un excès de protons. Pour pallier cette instabilité et revenir à un état stable, un proton du noyau (p) se transforme en neutron (n). Ce phénomène s'accompagne de l'émission d'un positon (e^+) et d'un neutrino (ν). Cette transformation nucléaire est appelée la désintégration β^+ (**Figure 1**).

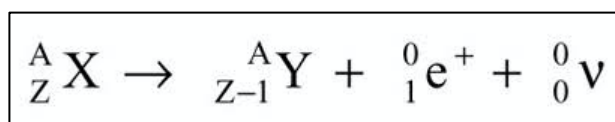


Figure 1 : Équation de la désintégration β^+

Le positon émis ne parcourt que quelques millimètres dans l'organisme au cours duquel il perd la totalité de son énergie cinétique avant d'interagir avec un électron libre du milieu. L'interaction provoque la transformation du couple électron-positon en deux photons gamma de haute énergie de 511 KeV. Cette transformation est connue sous le nom d'annihilation du positon (**Figure 2**). Ces photons sont émis dans une même direction mais en sens opposé et sont détectables à l'extérieur du corps. La caméra TEP va permettre de détecter ces deux photons et ainsi de localiser le lieu de désintégration du radionucléide.

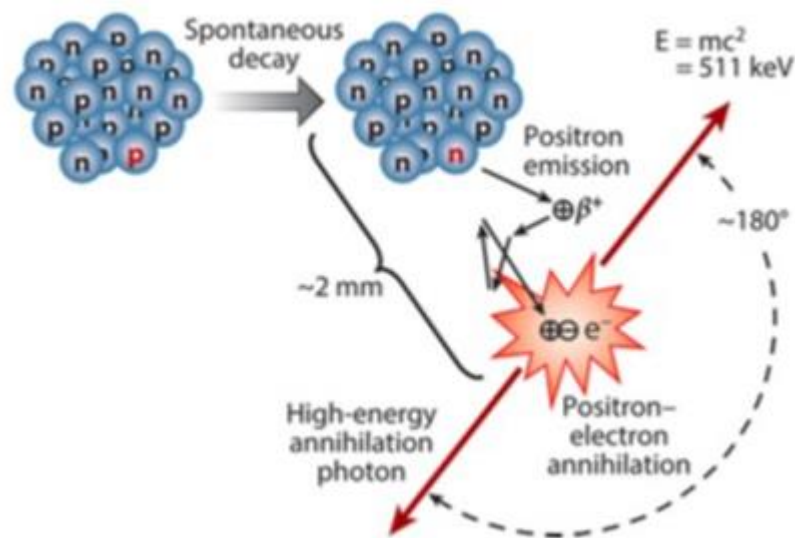


Figure 2 : Représentation de l'annihilation du positon (2)

b) Le principe de détection

Le principe de détection de la TEP repose sur une détection en coïncidence des deux photons gamma émis lors de l'annihilation du positon. La notion de coïncidence est très importante puisque tous les rayonnements émis ne seront pas forcements comptabilisés.

Pour détecter ces rayonnements, la caméra TEP dispose de plusieurs détecteurs configurés en anneaux. Le tout formant un cylindre de détection entourant le patient. Chaque anneau regroupe plusieurs détecteurs constitués de cristaux scintillateurs couplés à des photomultiplicateurs (PM). A chaque interaction d'un photon dans le scintillateur, celui-ci est converti en signal lumineux par une photocathode puis amplifié par le biais d'une

succession de dynodes. En fin de parcours dans le PM, une anode convertie ces photons lumineux en signal électronique qui sera ensuite traduit en image par un système informatique.

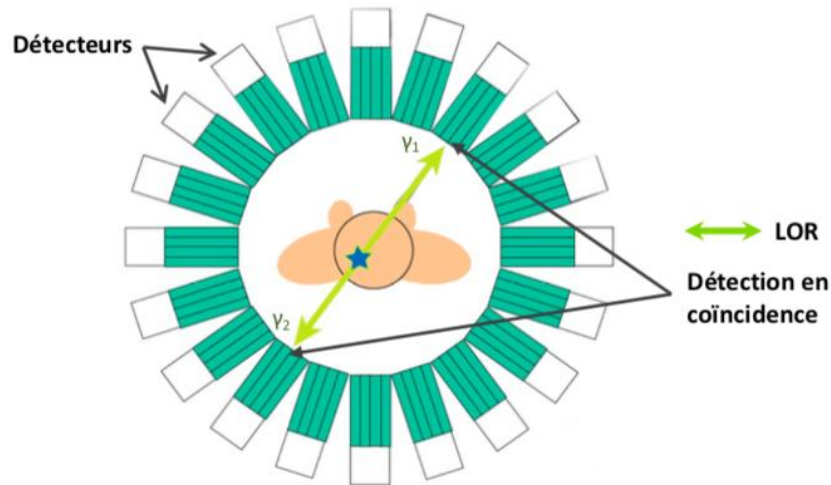


Figure 3 : Représentation schématique de la détection en coïncidence des photons

La détection des photons en coïncidence repose sur deux paramètres : la fenêtre temporelle et la fenêtre énergétique. Deux photons sont comptabilisés s'ils sont détectés dans un intervalle de temps très court (1 à 15 ns) et s'ils ont une énergie de l'ordre de 511 KeV. On les appelle des coïncidences vraies. La ligne joignant les deux détecteurs est appelée ligne de réponse (LOR) (**Figure 3**). Le calcul du croisement de toutes les LOR permet de localiser le lieu d'annihilation du positon. Si la position du positon au moment de son annihilation est déterminée de façon très précise dans l'espace, celle du noyau dont il est issu ne l'est pas. Ceci est à l'origine du manque de résolution de l'imagerie TEP et qui dépend du parcours du positon dans la matière. Ce parcours est fonction de l'énergie cinétique du positon lorsqu'il est émis à partir du noyau instable et qui est de l'ordre du millimètre jusqu'au centimètre pour les positons très énergétiques (3). Cependant, au cours de leur trajet, il arrive que des photons soient déviés ou que la LOR issue de deux photons gamma de désintégrations différentes arrivent simultanément sur le détecteur, on parle alors respectivement de coïncidence diffusée et de coïncidence fortuite (**Figure 4**).

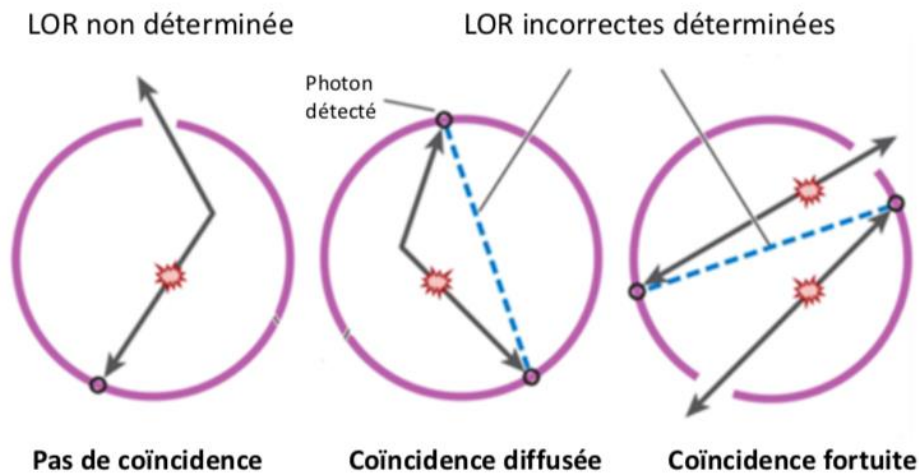


Figure 4 : Schéma des différentes coïncidences parasites rencontrées en TEP (2)

1.2. Quels radionucléides pour la TEP ?

Les radioéléments utilisés en imagerie TEP sont tous des émetteurs β^+ mais avec des caractéristiques physiques et chimiques différentes. Historiquement, le premier radioélément utilisé est le [18F]-Fluor. Celui-ci est couplé à un dérivé du glucose pour donner du [18F]-FDG pour 2-Désoxy-2-[18F]-Fluoro-D-Glucose, il est le radiotracteur le plus utilisé en TEP (90%) (4).

Cependant, tous les émetteurs β^+ ne sont pas appropriés pour être utilisés en TEP. Certaines caractéristiques doivent être prises en compte dans le choix du radioélément.

a) Le choix du radionucléide

Dans le cadre d'une application en imagerie TEP, le choix du radionucléide repose sur trois critères :

- Les caractéristiques chimiques :

Deux types de radionucléides sont utilisés : les métaux et les halogènes. Les halogènes présentent des caractéristiques communes qui font de ces éléments des donneurs d'électrons (caractère basique) capables de se fixer de façon covalente directement sur les vecteurs par substitution nucléophile lorsqu'ils sont au degré d'oxydation $-I$ et par substitution électrophile lorsqu'ils sont à des degrés d'oxydation supérieurs. En fonction de

la place des halogènes dans le tableau périodique des éléments, les potentiels standards d'oxydo-réduction associés sont plus ou moins forts allant de +1.36 V pour le couple $F_2/2F^-$ à 0.54 pour le couple $I_2/2I^-$. Ainsi, il sera beaucoup plus facile d'obtenir les différents degrés d'oxydation possibles des halogènes pour ceux situés dans le bas du tableau et qui vont de -I à +VII. C'est la principale raison pour laquelle les radiomarquages au [18F]-Fluor font intervenir la forme F^- (la forme F^+ nécessiterait des conditions oxydantes très fortes) et sont réalisés par substitution nucléophile alors que les radiomarquages à l'iode peuvent être réalisés des deux façons en pratique courante. A l'inverse, les métaux se caractérisent par le fait qu'ils sont accepteurs d'électron (caractère acide). Ils se lient au vecteur par des liaisons de coordination et dont la stabilité est régie par une constante d'équilibre K. Plus K est élevée et plus le complexe est stable. Dans tous les cas, les radiomarquages sont réalisés de façon indirecte.

- Caractéristiques physiques :

Tout d'abord, l'énergie et l'intensité d'émission sont des paramètres physiques à prendre en compte. Idéalement, les émetteurs de positons utilisés pour la TEP doivent avoir une énergie d'émission proche de la fenêtre énergétique de la caméra TEP, aux alentours des 511 KeV, avec une intensité d'émission de 100%. On peut citer le [15O]-Oxygène et le [11C]-Carbone qui se désintègre respectivement à 99,9% et 99,8% par émission β^+ . Mais la plupart des émetteurs de positons ont des émissions multiples dont l'émission gamma (**Tableau 1**). L'utilisation de ces émetteurs de position et dont l'émission de rayonnement gamma est proche de 511 KeV entraîne des photons gamma parasites qui seraient détectables par la caméra TEP et auraient un impact sur la qualité des images. Toutefois, il peut être intéressant d'utiliser ces émetteurs. En effet, dans un but théranostique, il peut être d'intérêt d'utiliser des radionucléides qui sont à la fois émetteurs de positons et d'électrons comme le [64Cu]-Cuivre ou le [152Tb]-Terbium. Un autre intérêt de choisir des radionucléides à émissions multiples est que l'on développe actuellement des détecteurs « basés sur ces émissions multiples » et qui permettent de localiser précisément la position du radionucléide émetteur de positon et non l'endroit de l'annihilation (5).

En ce qui concerne l'énergie des radioéléments, il est préférable d'utiliser ceux qui ont l'énergie la plus faible. Idéalement pour avoir une bonne résolution spatiale, la distance entre l'annihilation du positon et la désintégration du radioélément doit être la plus courte

possible. Cette distance dépend de l'énergie émise lors de la désintégration, plus l'énergie est forte et plus le lieu d'annihilation sera distant de la désintégration.

Le dernier paramètre physique à considérer est la période radioactive. Elle doit être suffisamment longue pour permettre la réalisation des images sans irradier le patient trop longtemps et doit également être compatible avec la demi-vie biologique du vecteur. L'utilisation d'émetteurs à courte période, tels que le [82Rb]-Rubidium et le [11C]-Carbone ($T_{1/2} = 1,26$ min et 20,4 min), est très restreinte en clinique (6). Cela nécessite pour le [11C]-Carbone d'avoir un cyclotron à proximité du lieu d'injection. En France, seuls certains sites spécialisés (Lyon, Caen, Paris) utilisent le [11C]-Carbone, notamment pour des applications en neurologie. Pour ce qui concerne le [82Rb]-Rubidium, obtenu par voie de générateur, très peu de sites utilisent ce radionucléide. En effet, il est réservé pour des applications en cardiologie, et permet l'obtention d'images de qualité supérieure à celles du technetium, avec des durées d'examen plus courtes. A l'inverse les radioéléments de longue période tels que le [64Cu]-Cuivre, [89Zr]-Zirconium et l'[124I]-Iode peuvent être utilisés pour développer des vecteurs de grandes demi-vies biologiques (de l'ordre du jour) comme les anticorps et permettent la réalisation d'une imagerie tardive (jusqu'à 4 jours après l'injection) (7). L'inconvénient de ces radioéléments est l'irradiation du patient.

- Mode de production :

Le mode de production influence également le choix du radionucléide car il conditionne leur disponibilité. La plupart des émetteurs β^+ sont produits dans des accélérateurs de particules appelés cyclotrons qui ne sont pas toujours situés à proximité des centres de médecine nucléaire. L'alternative est l'utilisation d'émetteurs β^+ issus de générateurs qui eux garantissent un libre accès et une autonomie pour les utilisateurs. Toutefois, il faut savoir que la plupart des radionucléides pères qui servent à la fabrication de ces générateurs, sont eux aussi obtenus par cyclotron, si bien qu'il peut là encore y avoir un problème de disponibilité, même avec les radionucléides émetteurs β^+ obtenus par générateur.

b) Les radionucléides utilisables en TEP

Différents radionucléides utilisables en TEP sont regroupés dans le Error! Reference source not found. :

Radionucléide	Demi-vie (h)	Énergie bêta +		Énergie gamma		Production
		E _{Max} (KeV)	Intensité (%)	E (KeV)	Intensité (%)	
Métaux						
[82Rb]-Rubidium	0,021	3381	81,81	511* 776,5	190,9 15,03	Générateur
[68Ga]-Gallium	1,13	1899,1	87,68	511*	177,8	Générateur
[44Sc]-Scandium	3,97	1474,3	94,27	511* 1157	188 99,88	Cyclotron et générateur
[64Cu]-Cuivre	12,7	653,1	17,52	511*	35,04	Cyclotron
[89Zr]-Zirconium	78,42	902	22,8	511* 908,97	45,6 99,03	Cyclotron
Halogènes						
[11C]-Carbone	0,34	960,5	99,75	511*	199,5	Cyclotron
[18F]-Fluor	1,83	633,9	96,86	511*	193,7	Cyclotron
[124I]-Iode	100	2138	10,7	511* 603 723 1691	45 62,9 10,4 11,2	Cyclotron
Lanthanides						
[152Tb]-Terbium	17,5	2967,8	100	511*	NR	Cyclotron

Tableau 1 : Principaux émetteurs β^+ utilisables en TEP

* représente les photons d'annihilation (source LNHB)

c) Les méthodes de radiomarquage

Le terme « radiomarquage » se définit comme le couplage d'une molécule ou d'un vecteur (ex : peptide, anticorps) à un radioélément. Ce processus peut être réalisé de façon directe ou indirecte.

Hormis pour l'iode 131 , les radiomarquages avec les halogènes se font de manière indirecte. Les vecteurs sont, dans un premier temps, fonctionnalisés par des groupements partants ou avec l'utilisation de synthons radiomarqués pour augmenter la stabilité des liaisons halogène-vecteur. Le marquage avec le radionucléide se fait par substitution nucléophile ou par substitution électrophile. Par exemple, les marquages de molécule par le fluor, F^- , se font quasiment par substitution nucléophile, la forme électrophile du fluor, F^+ , étant difficile à obtenir. A l'inverse, les marquages avec des atomes comme l'iode et le brome, se font par substitution électrophile. Dans les deux cas, la liaison des atomes entre eux est de type liaison covalente (C-F, C-I, C-Br).

Concernant les métaux, deux stratégies sont décrites dans la littérature et nécessitent l'ajout d'un agent bifonctionnel (ou agent complexant) qui se lie à la fois au vecteur et qui fixe le radioélément. La première consiste à coupler le radioélément à l'agent complexant pour former un intermédiaire radiomarqué stable capable de se fixer dans un second temps sur le vecteur. La seconde consiste à modifier dans un premier temps le vecteur avec l'agent complexant, puis de faire réagir le radioélément avec le vecteur modifié dans un second temps. En effet, dans ces cas, l'utilisation d'un marquage en deux étapes permet d'améliorer la stabilité des radiopharmaceutiques obtenus. Ces radiomarquages nécessitent la formation de plusieurs liaisons entre le vecteur et le radionucléide. On les nomme « liaisons de complexation ». Par exemple, le Gallium nécessite 6 liaisons de coordination et 4 liaisons sont nécessaires pour le cuivre.

Quelle que soit la technique employée, elle ne doit pas dénaturer la configuration du vecteur ni modifier ses propriétés pharmacocinétiques. Il est également préférable que le rendement de marquage soit suffisamment bon et le radiomarquage suffisamment stable in vivo.

I.3. La TEP-métabolique

a) Définition et utilisation en oncologie

La fixation spécifique cellulaire, tissulaire ou organique d'un radiopharmaceutique dépend parfois de son métabolisme. Dans ce cas, les images TEP obtenues sont dites TEP-métabolique. Le radiotracteur le plus utilisé dans la pratique clinique et particulièrement en oncologie est le [18F]-FluoroDesoxyGlucose ou [18F]-FDG en raison de l'augmentation de la consommation de glucose par les cellules tumorales, liée une surexpression des récepteurs de type GLUT-1 ainsi que des enzymes intracellulaires de phosphorylation du glucose (hexokinase). L'imagerie TEP-FDG est devenue un outil de référence pour le diagnostic, l'évaluation pronostique de la maladie et la réponse au traitement. Ses sensibilité et spécificité globales sont respectivement de 84% et 88% avec une résolution de quelques millimètres (8). Des données issues de la littérature regroupées dans le **Tableau 2** montrent des différences de sensibilité et spécificité en fonction de la pathologie cancéreuse. De plus, Salaün et al ont récemment émis des recommandations pour l'utilisation de la TEP en oncologie en fonction de l'indication (9).

Pathologie	Cancers colorectaux (10)	Lésions extra-hépatiques (11)	Cancer du poumon (12)	Myélome multiple (13)	Cancer du sein (14)
Sensibilité	97 %	91 %	96,8 %	90 %	63 %
Spécificité	76 %	98 %	77,8 %	70 à 100 %	94 %

Tableau 2 : Exemple de sensibilité et spécificité de la TEP par type de cancers

Elle est également un outil pronostic important dans le suivi des cancers pour l'évaluation de la survie des patients et prédictif pour évaluer une éventuelle réponse au traitement. L'utilisation du [18F]-FDG permet de quantifier le métabolisme glucidique des cellules et de distinguer les cellules cancéreuses qui sont dites « hypermétaboliques » et qui se différencient des cellules saines par un métabolisme élevé de glucose (15).

b) Description du traceur le plus utilisé en TEP métabolique : [18F]-FluoroDesoxyGlucose

Le [18F]-FDG est le premier radiopharmaceutique utilisé en imagerie métabolique TEP pour des applications en cancérologie. C'est un analogue du glucose marqué au fluor-18, émetteur de positon de période courte (110 min), en position 2 (**Figure 5**).

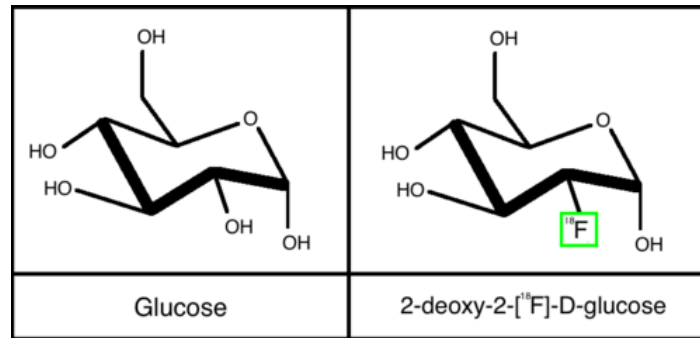


Figure 5 : Représentation schématique du glucose et de [18F]-FDG

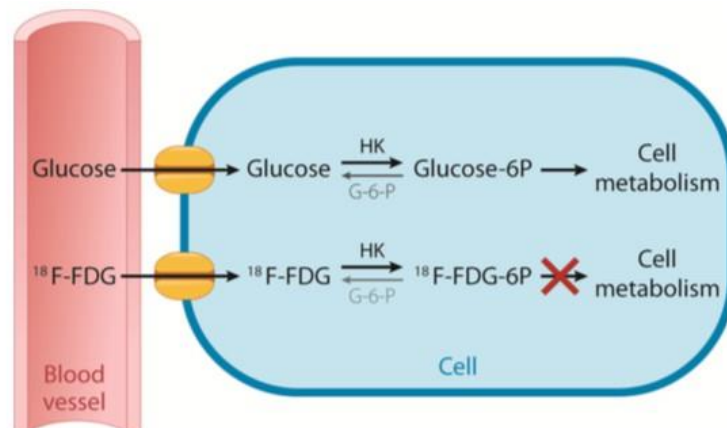


Figure 6 : Métabolisme du glucose et du [18F]-FDG

En condition normale, il pénètre dans les cellules via les transporteurs membranaires de type GLUT-1. Une fois internalisé dans la cellule, le FDG est phosphorylé en FDG-6 phosphate par une enzyme, l'hexokinase (HK). La présence du [18F] en position C-2 empêche la poursuite de la cascade de phosphorylation. Le FDG-6P reste piégé dans la cellule et s'y accumule (**Figure 6**).

En condition tumorale, les transporteurs GLUT-1 et l'hexokinase sont surexprimés ce qui accroît l'absorption de FDG dans la cellule. La surexpression de l'hexokinase favorise également la transformation du FDG en FDG-6P qui représente une impasse métabolique pour la cellule. Les charges associées aux phosphates empêchent le FDG-6P de ressortir du milieu intracellulaire. Ainsi, les deux types de dérégulation cellulaire engendrent une accumulation plus importante de FDG-6P (**Figure 7**). Au niveau de l'imagerie TEP, la différence de quantité de FDG permet de différencier les cellules normales des cellules tumorales.

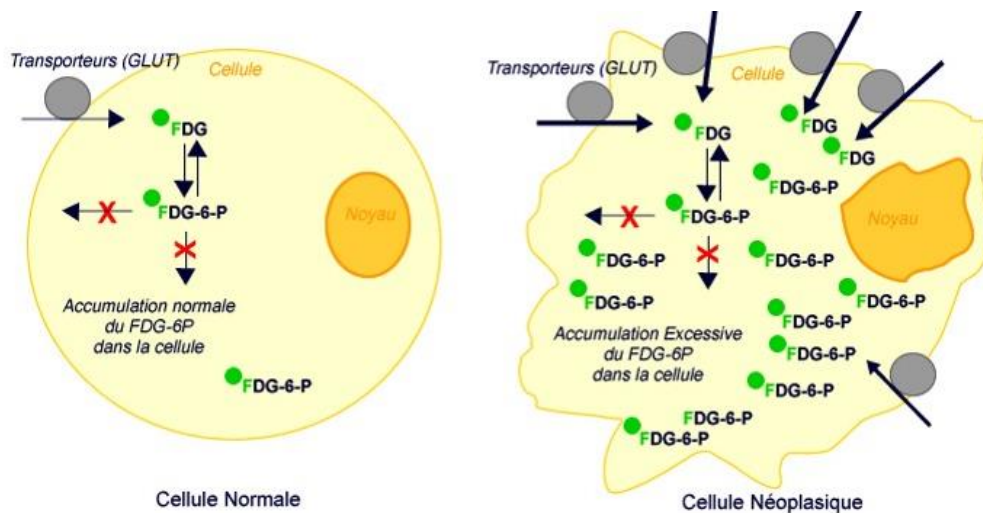


Figure 7 : Schéma représentant le métabolisme du FDG dans une cellule saine (à gauche) et une cellule tumorale (à droite)

c) Intérêts et limites d'utilisation de la TEP au FDG

En oncologie, l'utilisation du [18F]-FDG comme vecteur de la TEP métabolique présente de multiples intérêts :

- La TEP-FDG permet de détecter de manière non invasive les lésions cancéreuses en un seul examen sur tout le corps entier.
- Le [18F]-FDG agit comme un marqueur d'agressivité des cellules. Du fait d'un besoin plus important en glucose, les cellules dites « agressives » et de mauvais pronostic ont un métabolisme glucidique très supérieur et par conséquent une absorption plus importante du FDG.

- La TEP-FDG permet de détecter des changements de métabolisme du glucose dans les cellules cancéreuses avant et après une chirurgie, une radiothérapie ou une chimiothérapie (10), ce qui accroît sa valeur prédictive.

Mais bien qu'il soit utilisé dans le diagnostic de nombreux cancers, son intérêt est limité dans certains cas (16) :

- Le [18F]-FDG est un traceur non spécifique de l'imagerie TEP. Certains organes comme le système nerveux central et le myocarde sont des tissus très consommateurs de glucose, par conséquent une fixation intense du FDG est observée. L'appareil urinaire montre également une fixation intense dû à l'élimination physiologique du FDG. Pour ces raisons, il sera difficile de détecter des lésions cancéreuses au niveau de ces organes lors du bilan d'entrée.
- En cas d'inflammation, que ce soit dû à une infection ou une inflammation post thérapeutique, les cellules sont également avides et consommatrices de glucose. Elles deviennent donc positives au TEP-FDG ce qui peut fausser le diagnostic final (17).
- Dans des cas de tumeurs bien différenciées avec un grand temps de doublement, les cellules ne présentent pas d'hyper métabolisme glucidique et ne fixent donc pas plus le [18F]-FDG que les cellules normales adjacentes. Ces tumeurs ne pourront donc pas être visualisées. C'est le cas notamment de l'adénocarcinome prostatique bien différencié (18), du cancer du foie, des tumeurs du SNC et des tumeurs neuroendocrines (TNE) (19) qui donnent cette fois-ci des résultats faux négatifs à la TEP-FDG. Ce phénomène d'indolence des cellules tumorales qui entraîne des faux négatifs à la TEP métabolique est également à considérer en regard de l'hétérogénéité des tumeurs notamment en cas de cancers métastasés. En effet, les sites métastatiques à faible taux de division donc faible métabolisme, peuvent ne pas être visualisés ce qui peut entraîner une sous-évaluation de la maladie. Ce phénomène a notamment été décrit dans les prises en charge des patients atteints de myélome multiple, faisant considérer cet examen comme non indispensable dans le bilan initial des patients. Toutefois, cet examen reste indispensable dans le suivi de cette pathologie, qui présente souvent des phases de dé-différenciation donnant un regain d'intérêt à la TEP-FDG.

Pour pallier aux limites d'utilisation de la TEP au [18F]-FDG, d'autres radiopharmaceutiques traceurs TEP ont été développés pour explorer d'autres voies métaboliques que le glucose (**Tableau 3**). Toutefois, même si l'utilisation de voies métaboliques différentes du glucose permet dans certains cas d'améliorer la prise en charge des patients cancéreux, l'ensemble des radiopharmaceutiques utilisés présentent les mêmes inconvénients de manque de spécificité. Le développement de traceurs spécifiques de la cellule cancéreuse est actuellement en plein essor pour pallier cet inconvénient.

Médicament radiopharmaceutique	Voie métabolique	Indication diagnostique (AMM)	Références
[18F]-FluoroDOPA	Métabolisme dopaminergique	TNE	(20)
		Tumeurs du SNC	(21)
[18F]-FluoroCholine (FCH)	Traceur des lipides membranaires	Cancer prostate	(22,23)
		Carcinome hépatocellulaire	(24)
[18F]-Fluorure de sodium	Métabolisme osseux	Détection de métastases osseuses (cancer prostate)	(25)
[18F]-FluoroEthylTyrosine (FET)	Analogue de la tyrosine	Tumeurs du SNC (gliomes)	(26)

Tableau 3 : Autres radiopharmaceutiques traceurs de la TEP

I.4. La TEP-Phénotypique

a) Définition et utilisation en oncologie

Le principe de la TEP-phénotypique est le même que celui de la TEP-métabolique, on administre un radiopharmaceutique marqué à un émetteur $\beta +$ dans le but de détecter des lésions tumorales. Seulement, la détection ne repose plus sur un métabolisme commun à toutes les cellules et surexprimé par les cellules cancéreuses, mais sur leurs caractéristiques propres, c'est-à-dire leur expression phénotypique. Il faut toutefois prendre en compte le fait que les cellules tumorales sont issues de mutations plus ou moins nombreuses à partir

de cellules « normales » et que certains phénotypes tumoraux peuvent présenter des similitudes avec des lignées « saines ». Le choix de la cible est donc primordial pour l'imagerie phénotypique. Idéalement, la cible ne devra être exprimée que par les cellules tumorales et en quantité par cellule la plus forte possible. S'il est d'intérêt de cibler une spécificité tumorale, la prise en compte actuelle de la tumeur dans son environnement, implique que la visualisation de certaines cellules saines présentes dans cet environnement est considérée comme faisant partie intégrante du phénotype tumoral. Les vecteurs utilisés en imagerie phénotypique sont variés (petites molécules, peptides, anticorps) et leur développement permet de cibler les acteurs responsables de l'apparition des cellules cancéreuses. Cette technique d'imagerie permet de mesurer les caractéristiques phénotypiques de la tumeur pour prédire le comportement clinique (27).

Plusieurs radiopharmaceutiques TEP ont récemment été développés ou sont en cours de développement pour réaliser des examens d'imagerie fonctionnelle phénotypique. A ce jour, un radiopharmaceutique a obtenu une AMM pour la détection des tumeurs primitives et les métastases des patients atteints de TNE-gastroentéropancréatique : le Somakit® ou [68Ga]-DOTATOC. Il s'agit d'un decapeptide qui, marqué au [68Ga]-Gallium, se fixe préférentiellement sur les récepteurs SST2 surexprimés à la surface des cellules des TNE (28). Un autre radiopharmaceutique est utilisé dans le cadre d'une ATU nominative en cas de récurrence du cancer de la prostate : le [68Ga]-PSMA-11 (29,30). Il s'agit d'un ligand de l'antigène spécifique membranaire de la prostate (PSMA) marqué au [68Ga]-Gallium. La séquence Glutamine-urée-Lysine incluse dans tous les inhibiteurs pseudopeptidiques spécifiques du PSMA est reconnue par la partie qui assure l'activité enzymatique de cette protéine surexprimée à surface des cellules cancéreuses prostatiques. D'autres agents phénotypiques sont actuellement au stade de recherche clinique et les plus avancés sont décrits dans le **Tableau 4**. Parmi ceux-ci, nous nous intéresserons plus particulièrement dans ce mémoire aux ligands inhibiteurs des récepteurs aux chimiokines.

Ref	Molécule	Statut		Radioélément	Indication
(31,32)	Trastuzumab	Anticorps		[64Cu] / [89Zr]	Métastases du cancer du sein HER+
(33,34)	ATSM	Marqueur de l'hypoxie	de	[64Cu]	Glioblastome
(35)	Pentixafor	Ligands inhibiteurs des chimiokines		[68Ga]	Athérosclérose
(36)	Pentixather	Ligands inhibiteurs des chimiokines		[177Lu]	Lymphome, leucémie, myélome multiple
(37,38)	Analogue de la bombésine	Peptide		[68Ga]	Gliome, cancer prostate

Tableau 4 : Exemples d'agents phénotypiques au stade de recherche clinique

b) Le récepteur de chimiokine CXCR4

Le récepteur au chimiokine de type 4 (CXCR4), ou C-X-C chemokine receptor type 4 en anglais, est un récepteur membranaire couplé à une protéine G qui intervient dans plusieurs phénomènes physiologiques (immunité, hématopoïèse, embryogenèse) et pathologiques (auto-immunes, oncologiques, neurologiques) (39). Initialement, le CXCR4 a été identifié comme co-récepteur responsable de l'entrée du VIH en 1996 (40). Dans le but de bloquer l'entrée du virus dans la cellule, plus de 100 molécules chimiques inhibitrices du CXCR4 ont été étudiées sur des modèles cellulaires, mais aucune n'a été utilisée pour cette application antivirale. Au début des années 2000, son implication dans le développement de métastases a été démontré par Müller *et al* dans le cancer du sein (41), insufflant ainsi un regain d'intérêt pour cette classe de médicament.

En oncologie, ce récepteur et son ligand spécifique, C-X-C chemokine ligand 12 (CXCL12), sont impliqués dans la croissance tumorale, la migration des cellules cancéreuses et la formation de sites métastatiques. On le retrouve surexprimé dans plus de 70% des tumeurs solides (cancer du sein, cancer de la prostate, mélanome, myélome multiple...) (42). Ce couple ligand/récepteur agit selon deux mécanismes dans la prolifération tumorale :

- 1) la fixation du CXCL12 sur le CXCR4 active celui-ci, provoquant une cascade de réactions enzymatiques qui induisent la migration, la survie et la prolifération des cellules tumorales (39,43). L'utilisation d'agents inhibiteurs a donc un intérêt pharmacologique potentiel et doit également permettre le développement de nouveaux vecteurs de radioactivité.
- 2) les organes à haut niveau d'expression de CXCL12 (foie, moelle osseuse, poumon) attirent les cellules cancéreuses circulantes exprimant le CXCR4, ce qui en font des sites métastatiques probables (44).

C'est pourquoi le blocage de cet axe CXCR4/CXCL12 apparaît comme prometteur dans la lutte contre le cancer. L'utilisation d'antagonistes du récepteur CXCR4 peut être un bon point de départ.

c) Les antagonistes du CXCR4 en TEP

Le premier antagoniste du CXCR4 approuvé par les autorités est le Plerixafor (Mozobil®). Le blocage du CXCR4 par le Plerixafor induit une mobilisation des cellules de la moelle osseuse dans le sang périphérique qui sont alors collectées et triées en vue d'une autogreffe. Cette indication a été validée en 2008 chez les patients atteints de lymphome ou de myélome multiple. En médecine nucléaire et plus précisément en TEP, certaines molécules ont été radiomarquées par différents radioéléments β^+ et β^- et sont en voie de développement. Elles sont regroupées en **Annexe 1** (43,45) et font partie de deux classes chimiques différentes : les macrocycles azotés et les peptides.

Les différentes structures, développées dans le cadre de la lutte anti virale et non encore exploitées pour des applications en imagerie, représentent un réservoir de vecteur potentiel pour améliorer l'imagerie phénotypique de CXCR4. D'autre part, d'autres types de récepteurs aux chimiokines ont été décrits dans la littérature comme d'intérêt en cancérologie, notamment le CXCR7. Ces autres types de récepteurs pourraient devenir des cibles de choix en médecine nucléaire.

d) Le DOTA-Pentixafor

Le DOTA-Pentixafor est un pentapeptide couplé au DOTA. Le cycle peptidique tendu présente un pôle lipophile et un pôle chargé positivement qui sont tous deux impliqués dans la reconnaissance du récepteur. Le DOTA est un agent de complexation ubiquitaire qui

permet le radiomarquage du vecteur par de nombreux métaux comme le [68]-Gallium ou le [177]-Lutécium. Un « linker », l'acide aminéthylbenzoïque (AMB), permet d'établir la liaison entre le peptide et le DOTA (**Figure 8**).

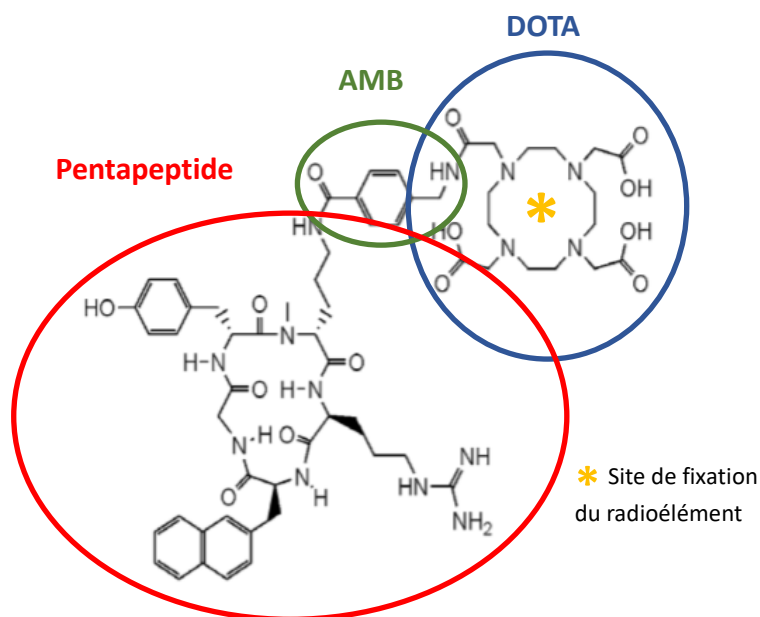


Figure 8 : Représentation chimique du DOTA-Pentixafor

Cet antagoniste du récepteur CXCR4 fait actuellement l'objet de recherches dans plusieurs indications et montrent des signes d'efficacité. Des exemples sont présentés dans le **tableau 5**.

Radionucléide	Étude	Pathologie	Références
[68]-Gallium	Préclinique et clinique	Cancer du poumon à petites cellules	(42,43,46)
[68]-Gallium	Clinique	Lésions athéromes	(35)
[68]-Gallium	Préclinique et clinique	Myélome multiple	(47,48)
[68]-Gallium	Clinique	Glioblastome	(49)
[68]-Gallium	Préclinique et Clinique	Infarctus du myocarde	(50,51)
[18]-Fluor	Préclinique	Lymphome	(52)

Tableau 5 : Tableau regroupant des recherches en cours sur le DOTA-Pentixafor

II. LE GALLIUM-68

Le Gallium est l'un des trois éléments chimiques appartenant à la famille des métaux de post-transitions (ou groupe 13) avec l'Indium et le Thallium. Les métaux du groupe 13 sont utilisés dans le domaine de la médecine nucléaire. A ce jour, 3 radio-isotopes du gallium sont utilisables : le Gallium-66 (très peu utilisé car il émet un rayonnement gamma de haute énergie associé à une émission β^+), le Gallium-67 (de moins en moins utilisé en pratique) et le Gallium-68.

II.1. Propriétés chimiques du Gallium-68

En solution aqueuse, le degré d'oxydation prédominant du gallium est l'état +III. L'ion Ga^{3+} libre hydraté n'est stable qu'en condition acide. Le Gallium est dit amphotère, c'est-à-dire qu'il peut jouer le rôle d'un acide ou d'une base en fonction du milieu dans lequel il se trouve. Le pH de la solution est donc un facteur important lors des réactions de complexation puisque qu'il influe sur la forme chimique du gallium. Pour des valeurs de pH entre 4 et 7, le Ga^{3+} s'hydrolyse et forme des hydroxydes insolubles ; à pH physiologique (>7) il se solubilise en ion gallate $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ (53–56). Pour stabiliser le Ga^{3+} dans l'eau et éviter qu'il ne s'hydrolyse en $\text{Ga}(\text{OH})_3$, on l'associe à des sels comme l'acétate de sodium, le citrate de sodium ou le formiate de sodium qui forment des complexes plus ou moins stables. Le citrate est difficilement dissocié et n'est pas favorable aux phénomènes de transchéliation. Il n'est généralement pas utilisé pour les radiomarquages. L'acétate et le formiate, quant à eux, forment des complexes facilement dissociés et sont le plus souvent retrouvés dans les protocoles de radiomarquage. Dès que le $\text{pH} > 4$, la faible stabilité des complexes d'acétate et de formiate fait que l'on retrouve les formations d'hydroxydes, limitant d'autant la gamme des pH compatibles avec des radiomarquages de molécules par cet élément.

Le gallium est un acide de Lewis dur, c'est-à-dire faiblement électronégatif et accepteur d'électron. Le Ga^{3+} forme des complexes thermodynamiquement stables avec des ligands dits « bases fortes de Lewis ». Ces ligands sont des donneurs d'électrons composés d'oxygène, d'azote et dans une moindre mesure, de soufre (base moins dure que les précédents) (54). En présence d'halogénures en forte concentration, il va former des complexes chargés négativement qui peuvent être exploités lors de techniques de purification par échanges d'ions. En pratique professionnelle, on utilise des poly azamacrocycles ou des ligands pré orientés dans l'espace pour complexer le gallium. Parmi les ligands les plus souvent retrouvés, on peut citer : le DOTA, le NOTA et l'HBED (**Tableau 6**).

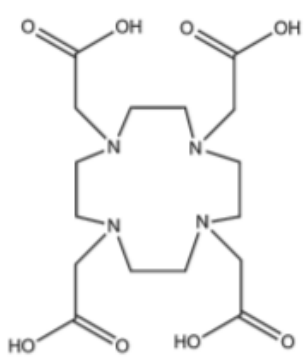
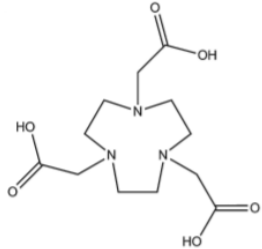
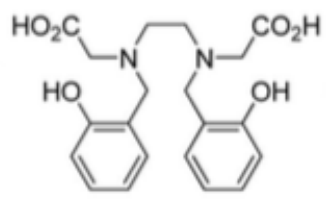
Ligands	DOTA	NOTA	HBED
Nom	Acide 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacétique	Acide (1,4,7-triazanonane-1,4,7-triyl) triacétique	Acide N,N'-bis[hydroxy-5-(carboxyethyl)benzyl]éthylènediamine-N,N'- diacétique
Structure (53,56)			
Conditions de marquage (57)	Chauffage à $> 90^{\circ}C$	Température ambiante	Température ambiante
Stabilité du complexe (58)	Log K = 21,33 pM = 18,5	Log K = 30,98 pM = 27,9	Log K = 38 pM = 28,6

Tableau 6 : Caractéristiques des principaux ligands du Gallium

II.2 Propriétés physiques du Gallium-68

Le [68Ga]-Gallium ([68Ga]) est un émetteur de positon de haute énergie et de courte période (67,8 min) qui se désintègre en un élément stable le [68Zn]-Zinc selon deux modes de transformation nucléaire. La désintégration majoritaire (88%) est la désintégration par émission de positon β^+ : lorsque le noyau instable se trouve sur un niveau d'énergie potentielle élevée et supérieure à 1,022 MeV, un proton de ce noyau se transforme en neutron par échange de quarks. Ce phénomène s'accompagne de l'émission d'un positon et d'un neutrino hors du noyau (**Figure 9**).

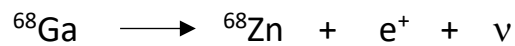


Figure 9 : Désintégration beta + du [68Ga]-Gallium

Le second mode de désintégration minoritaire (12%) est la désintégration par capture électronique (CE) : le noyau du [68Ga] capture un électron (e^-) de son propre cortège électronique, ce phénomène s'accompagne de la formation d'un neutrino et l'émission de photons X suite au réarrangement du cortège électronique (**Figure 10**).

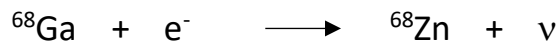


Figure 10 : Capture électronique du [68Ga]-Gallium

Lorsque la transformation nucléaire du [68Ga] aboutie sur un état excité du [68Zn] (3 % des cas), il y a émission d'un rayonnement gamma de haute énergie (1077 KeV) qui doit être pris en compte dans les mesures de radioprotection (**Figure 11**).

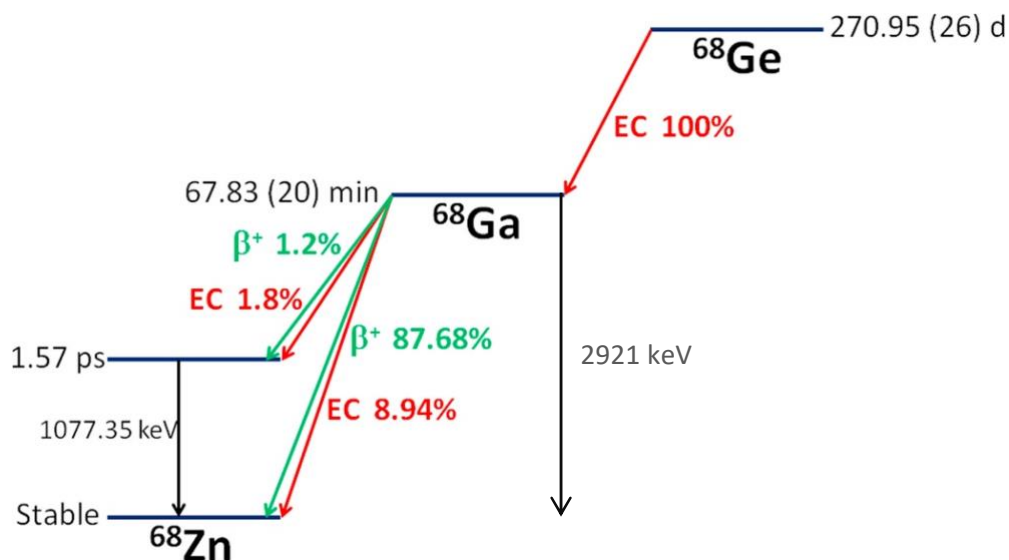


Figure 11 : Représentation schématique de la désintégration du [68Ga] (59)

Le delta d'énergie entre l'énergie potentielle du noyau de [68Ga] et celle du [68Zn] est de 2921 keV. Si l'on néglige l'énergie de recul du noyau de gallium lors de la désintégration, l'énergie emportée par la particule β^+ est de 1899 keV (**Tableau 7**). Cela correspond à des hautes énergies β non favorables en termes de résolution d'imagerie TEP. En effet, comparativement au parcours du positon émis par le [18F] dans l'eau (2,4 mm), dans le cas du [68Ga], ce parcours est quasiment le quadruple 8,2 mm .

La période d'environ 1h du [68Ga] est par contre une caractéristique intéressante en termes de radioprotection du patient. En effet, la demi-vie effective des radiopharmaceutiques galliés sera, dans tous les cas, limitée par cette période et toujours inférieure à 67,8 min. Ce paramètre influe directement sur la dose reçue puisque cette dernière dépend directement de l'activité cumulée dans l'organisme. A titre d'exemple, pour un radio pharmaceutique fluoré, de même demi-vie biologique qu'un radiopharmaceutique gallié, la dose équivalente reçue par le patient est à peu près équivalente. A titre d'exemple, la dose équivalente des dérivés galliés de la somatostatine : [68Ga]-DOTATATE, [68Ga]-DOTATOC et [68Ga]-DOTANOC est respectivement de 0,0257 mSv/MBq, 0,023 mSv/MBq, 0,0167 mSv/MBq et comparée au [18F]-FDG qui est de 0,019 mSv/MBq (60). D'autre part, cette période effective courte est également intéressante en termes d'organisation des services de médecine nucléaire dans la mesure où l'imagerie des patients doit être faite dans les 2 à 4 h qui suivent l'injection du produit. Par contre, cette contrainte de temps entre l'injection et l'acquisition

des images peut nuire à leur qualité si les radiopharmaceutiques utilisés se caractérisent par des cinétiques de distribution et/ou d'élimination lentes.

Radionucléide	Émission électronique			Émission photonique		
	Type	Énergie max (KeV)	Probabilité d'émission (%)	Type	Énergie (KeV)	Probabilité d'émission (%)
[68Ga]	β^+	822	1,2	γ	1077	3,24
		1899	87,68			
	CE	2921	8,94		511	178
		1843	1,8			

Tableau 7 : Principaux rayonnements et émissions du Gallium-68

II.3 Mode de production du Gallium-68

Le gallium-68 peut être obtenu selon deux modes de production : à partir d'un générateur ou à partir d'un cyclotron. Le mode de production le plus utilisé est celui qui consiste à séparer le gallium de sa filiation radioactive à partir du [68Ge]-Germanium ([68Ge]). Le second fait l'objet de travaux de recherche et n'est pas utilisé à ce jour en routine clinique. Il est basé sur l'irradiation en cyclotron d'une cible de [68Zn] par des protons de 13 à 14 MeV suivant une réaction $^{68}\text{Zn}(n,p)^{68}\text{Ga}$ (61). Reste que ce dernier mode de production impose une proximité entre le centre de production et le lieu d'utilisation, compte tenu de la courte période du [68Ga]. En conséquence, nous ne détaillerons dans ce mémoire que le mode de production à partir de générateur.

a) Le principe de fonctionnement d'un générateur

Un générateur se définit comme « un système contenant un radionucléide parent ... servant à la production d'un radionucléide de filiation obtenu par élution ou par toute autre méthode et utilisé dans un médicament radiopharmaceutique » (62).

Le principe d'un générateur repose sur une séparation chimique efficace des deux radionucléides de filiation. Elle est permise si les radionucléides père et fils ont des propriétés chimiques différentes (55). La séparation par chromatographie liquide/solide est la plus courante : le radioélément père est retenu de façon stable sur la phase solide et le radioélément fils n'ayant presque pas d'affinité pour cette phase est entraîné lors du passage d'une solution liquide ou éluant. Dans le langage professionnel, la séparation chromatographique d'un des éléments d'une filiation radioactive est appelée élution. Après séparation, on récupère le radionucléide d'intérêt sous la forme d'une solution appelée éluat. Pour des applications en pharmacie, des contrôles qualités sont effectués afin de déterminer le rendement d'élution (activité mesurée de l'élément fils sur l'activité théorique de l'élément fils), la pureté radiochimique (PRC) de l'éluat (activité du fils dans la forme chimique attendue sur l'activité totale du fils) et sa pureté radionucléidique (PRN) (activité mesurée du fils sur l'activité totale).

Il existe différents types de générateurs qui sont présentés dans le **Tableau 8**.

Générateur	Élément père	Élément fils	Utilisation
Molybdène/Technetium	[99Mo]-Molybdène	[99mTc]-Technetium métastable	Diagnostic clinique SPECT multiple (le plus utilisé)
Rubidium/Krypton	[81Rb]-Rubidium	[81mKr]-Krypton métastable	Diagnostic SPECT pour la ventilation pulmonaire (très peu utilisé)
Strontium/Yttrium	[90Sr]-Strontium	[90Y]-Yttrium	Production industrielle (radioimmunothérapie ou PRRT)
Strontium/Rubidium	[82Sr]-Strontium	[82Rb]-Rubidium	Diagnostic PET pour la perfusion myocardique (AMM aux USA)
Germanium/Gallium	[68Ge]-Germanium	[68Ga]-Gallium	Diagnostic TEP

Tableau 8 : Ensemble des générateurs disponibles

b) Le générateur de Germanium-68/Gallium-68

Dans le cas du générateur $[^{68}\text{Ge}]/[^{68}\text{Ga}]$: l'élément père, le $[^{68}\text{Ge}]$ de longue période ($T_{1/2[^{68}\text{Ge}]} = 271$ jours), se désintègre totalement en $[^{68}\text{Ga}]$, élément fils, par CE (**Figure 11**).

Le premier concept de générateur de $[^{68}\text{Ge}]/[^{68}\text{Ga}]$ est apparu dans les années 60 mais leur utilisation explose depuis une dizaine d'année avec le développement de l'imagerie phénotypique TEP (63). Les premiers générateurs de $[^{68}\text{Ga}]$ étaient vulgairement appelé « A Positron Cow » ou « Une vache à positons » (64) ; et leur fonctionnement était basé sur une extraction liquide-liquide. Peu de temps après, *Yano et Anger* ont développé une méthode d'extraction basée sur l'utilisation d'une colonne inorganique d'alumine éluée avec de l'EDTA (65). Cependant, ce solvant d'élution aboutit à la formation d'un complexe $[^{68}\text{Ga}]$ -EDTA inerte nécessitant un traitement supplémentaire pour obtenir le radionucléide et diminue ainsi le rendement d'élution (55). C'est pourquoi d'autres méthodes d'élution ont été développées (63,66) : en utilisant des matrices inorganiques (Al_2O_3 , SnO_2 , TiO_2) ou organiques éluées avec de l'acide chlorhydrique (HCl). L'utilisation d'HCl permet d'obtenir le gallium sous une forme chimique adaptée au radiomarquage : $^{68}\text{GaCl}_4^-$ ou $^{68}\text{GaCl}_3$ en fonction de la technique d'élution des générateurs et/ou des prétraitements de l'éluat.

Actuellement, deux générateurs de $[^{68}\text{Ge}]/[^{68}\text{Ga}]$ ont une AMM et sont commercialisés en France, leurs caractéristiques sont présentées dans le **Tableau 9**.

Nom commercial	GalliaPharm® (67)	Galli Ad® (68)
Laboratoire	Eckert & Ziegler	IRE-ELIT
Colonne	TiO_2	TiO_2
Éluant	HCl 0,1 M	HCl 0,1 M
Volume d'élution	5 mL	1,1 mL
Rendement	> 60 %	> 55 %
Impuretés $[^{68}\text{Ge}]$	< 0,001 %	< 0,001 %
Statut	AMM (2014)	AMM (2018)

Tableau 9 : Caractéristiques des générateurs de $[^{68}\text{Ge}]/[^{68}\text{Ga}]$ sur le marché français

Le chlorure de gallium obtenu à la suite de l'élution ne peut pas être administré directement en l'état, c'est une solution « précurseur » destinée au radiomarquage de molécules. Pour des raisons de radioprotection, l'élution de ce générateur est réalisée de manière automatisée (pousse seringue, automate de synthèse). Généralement, l'éluat est automatiquement transféré du générateur au réacteur de synthèse et doit être conforme aux exigences de la Pharmacopée qui sont détaillées dans le **Tableau 10**.

<i>Contrôle</i>	<i>Spécifications</i>
<i>Caractères organoleptiques</i>	Limpide, incolore et exempt de particules en suspension
<i>Identification du radionucléide</i>	Mesure par spectrométrie gamma : visualisation d'un pic à 511 KeV. En pratique, le pic à 1077 KeV n'est pas visible car masqué par le pic somme à 1022 KeV ; ou Détermination de la période physique : 62 à 74 min (méthode courante)
<i>PRC</i>	[68Ga] ³⁺ > 95 %
<i>Impuretés métalliques</i>	Zn ²⁺ , Fe ³⁺ < 10 µg/GBq
<i>PRN</i>	[68Ga] > 99,9 % [68Ge] < 0,001 %

Tableau 10 : Caractéristiques de l'éluat de [68]Gallium selon la pharmacopée européenne (69)

En routine, les contrôles sont effectués sur le radiopharmaceutique produit à l'issue de la synthèse. Les plus courants mis en place sont :

- l'analyse des caractères organoleptiques
- la détermination de la PRC en recherchant les ions Ga³⁺ libres et le gallium hydrolysé Ga(OH)₃
- la détermination de la PRN

En plus de ces exigences, le produit fini doit être conforme aux exigences des solutions injectables (stérilité, recherche d'endotoxines).

Ce générateur est dit en « équilibre séculaire » du fait de la grande différence de période entre les deux radioéléments. C'est-à-dire que l'activité du $[^{68}\text{Ge}]$ ne décroît pratiquement pas durant plusieurs demi-vies du $[^{68}\text{Ga}]$, et nous permet de l'utiliser pendant plusieurs mois voire même un an contrairement au générateur de $[^{99}\text{Mo}]$ -Molybdène/ $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ -Technétium qui s'utilise environ pendant une semaine. Selon le profil d'élué présenté en **Figure 12**, après un délai de 4h post élution, on obtient 90% de l'activité totale et 100% au bout de 7h, c'est pourquoi il peut être élué plusieurs fois par jour ce qui permet de couvrir les besoins quotidiens des services.

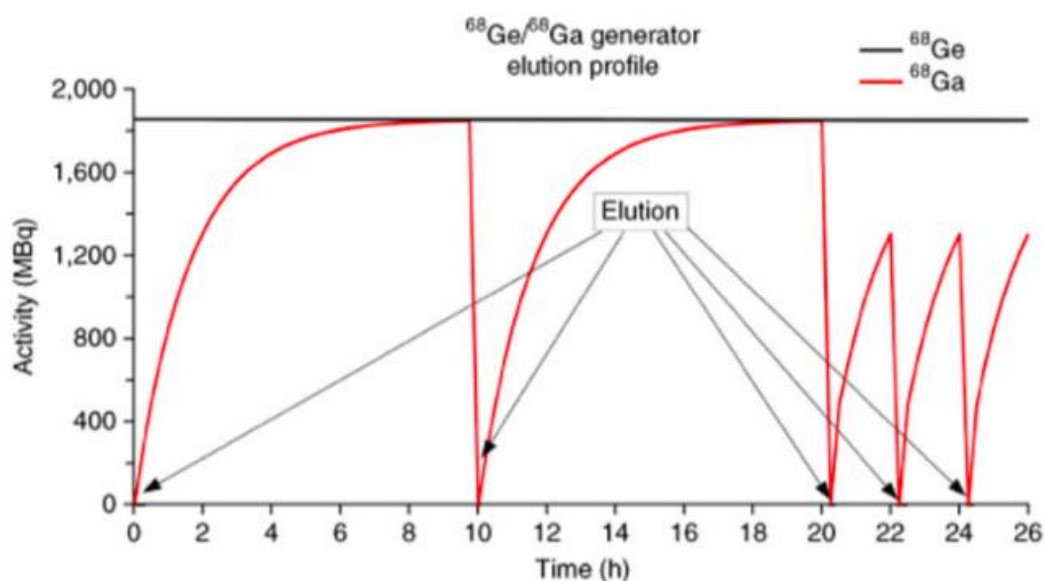


Figure 12 : Profil d'élué d'un générateur Ge/Ga (70)

c) Mode de production du Germanium-68

Le $[^{68}\text{Ge}]$ est quant à lui obtenu grâce à un accélérateur de particules circulaire que l'on nomme cyclotron. Un cyclotron est une enceinte circulaire au sein de laquelle des particules chargées sont accélérées à très grande vitesse puis déviées pour irradier une cible afin de produire des radionucléides par réaction nucléaire. Plusieurs réactions nucléaires peuvent aboutir à la production de $[^{68}\text{Ge}]$ et sont regroupées dans le **Tableau 11** (71).

Particle	Nuclear reaction	Target nucleus
Proton	(p,2n)	⁶⁹ Ga
Proton	(p,xn), x = 2, 4	^{nat} Ga (^{69,71} Ga)
Proton	(p,pxn)	^{nat} Ge
Proton	(p,xnyp), y = 2, 4, 6,...	⁷⁵ As, ^{79,81} Br, ^{85,87} Rb
Deuteron	(d,3n)	⁶⁹ Ga
Helium-4	(α,2n)	⁶⁶ Zn
Helium-3	(³ He,xn), x = 1, 2, 3	^{66,67,68} Zn

Tableau 11 : Principales réactions nucléaires produisant du [68Ge]-Germanium

Sa production n'est réalisable qu'avec des cyclotrons de haute énergie et une irradiation des cibles de plusieurs jours. Seuls quelques cyclotrons sont capables de produire du [68Ge] en routine dans le monde. Leur mode de production varie selon les caractéristiques de la cible (épaisseur, nature, support), le faisceau employé (nature, intensité), le temps d'irradiation. L'ensemble des paramètres des différents cyclotrons est regroupé dans le **Tableau 12** (71). Selon l'IAEA, la voie de production irradiant des cibles de gallium par des protons $Ga(p,xn)Ge$ est la plus efficace et la plus utilisée.

Accelerator site	Target	Irradiation parameters				Product activity	
		E_p (MeV)	T (h)	I (μ A)	Power (mAh)	A (GBq)	Yield (Ci/Ah)
Cyclotron Co., Ltd, Obninsk [2.6]	Ga ₄ Ni on Cu backing	23	120–240				
iThemba Laboratories/NAC [2.41, 2.42]	4.0 g Ga in 5.2 g Nb	36			37	16.6	
	4.5 g Ga ₂ O in Al	2–34		65			15.1
Brookhaven National Laboratory [2.38]	81 g Ga in Nb	30	640	85	45–55	33–51	
Los Alamos National Laboratory [2.39, 2.40]	4 g Ga in 5 g Nb (part of stack)	~60	492	125		70	32
Institute of Nuclear Physics, Kazakhstan [2.43, 2.44]	5 g Ga in Nb	30		40	14	12.4	
Institute for Nuclear Research, Moscow [2.45]	Ga	50–15	250			18.5	
Orsay [2.46]	3 mm Ga ₄ Ni in Ti (24 μ m)	20 (19.5)	60	45			9.2

Tableau 12 : Paramètres de production du [68Ge]-Germanium des différents cyclotrons

II.4. L'intérêt porté au Gallium-68

Le [68Ga] a été choisi pour élaborer des radiomarquages car il présente de nombreux avantages par rapport aux autres radionucléides TEP :

- Le [68Ga]-Gallium donne des complexes très stables avec de nombreux agents de complexation poly amino acides (4). Les ligands du gallium les plus souvent retrouvés sont ceux décrits dans le **Tableau 6**.
- Sa période physique (67,8 min) est en rapport avec les demi-vies plasmatiques de nombreux vecteurs peptidiques ce qui permet une diffusion rapide, une clairance sanguine rapide et une bonne localisation des cibles tumorales (72).
- Son mode production via un générateur est un avantage considérable. La longue période du [68Ge]-Germanium permet d'approvisionner les services en radiopharmaceutiques galliés sur des durées de l'ordre d'une année. De plus, si le générateur est utilisé de façon optimale (1 à 2 éluions quotidiennes) le coût des radiopharmaceutiques est comparable voire inférieur en comparaison aux radiopharmaceutiques fluorés.

III. LE DOSSIER DU MEDICAMENT EXPÉRIMENTAL

III.1. La recherche impliquant la personne humaine

a) La législation des essais cliniques

Au niveau Européen, les états membres de l'union européenne appliquent la **directive 2001/20/EC** du 4 Avril 2001 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à l'application de bonnes pratiques cliniques dans la conduite d'essais cliniques de médicaments à usage humain. Mais depuis le conseil du 16 avril 2014, le parlement européen a adopté un nouveau règlement sur les essais cliniques : le **règlement européen n°536/2014** qui abrogera la directive 2001/20/EC lorsqu'il sera applicable (prévu initialement pour mai 2020 mais pas encore actif) (73).

Au niveau national, la législation a rapidement encadré les essais cliniques avec la loi n°88-1138 du 20 décembre 1988 appelée loi Huriet relative à la protection des personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales (74). Actuellement, les essais cliniques sont régis par la **loi n° 2012-300** du 5 mars 2012 relative aux recherches impliquant la personne humaine (RIPH) dite loi Jardé. Cette loi a été modifiée par l'**ordonnance 2016-800** du 16 juin 2016 qui définit 3 catégories de recherche (75,76) (**Figure 13**) :

- Catégorie 1 : les recherches interventionnelles qui comportent une intervention sur la personne non justifiée par sa prise en charge habituelle. Elles ne peuvent être mises en œuvre qu'après autorisation de l'ANSM et avis favorable d'un comité de protection des personnes (CPP).

- Catégorie 2 : les recherches interventionnelles qui ne comportent que des risques et des contraintes minimales (prélèvement veineux sanguins, imagerie non invasive...), dont la liste est fixée par un arrêté du ministre chargé de la santé. Elles ne peuvent être mises en œuvre qu'après avis du directeur de l'ANSM et avis favorable d'un CPP.

- Catégorie 3 : les recherches non interventionnelles ou observationnelles qui ne comportent aucun risque ni contrainte dans lesquelles tous les actes sont pratiqués et les produits utilisés de manière habituelle (observance des traitements, étude des pratiques ...). Elles ne peuvent être mises en œuvre qu'après avis favorable d'un CPP, l'autorisation de l'ANSM n'est pas requise.

DÉMARCHES RÉGLEMENTAIRES EN FONCTION DU PROJET

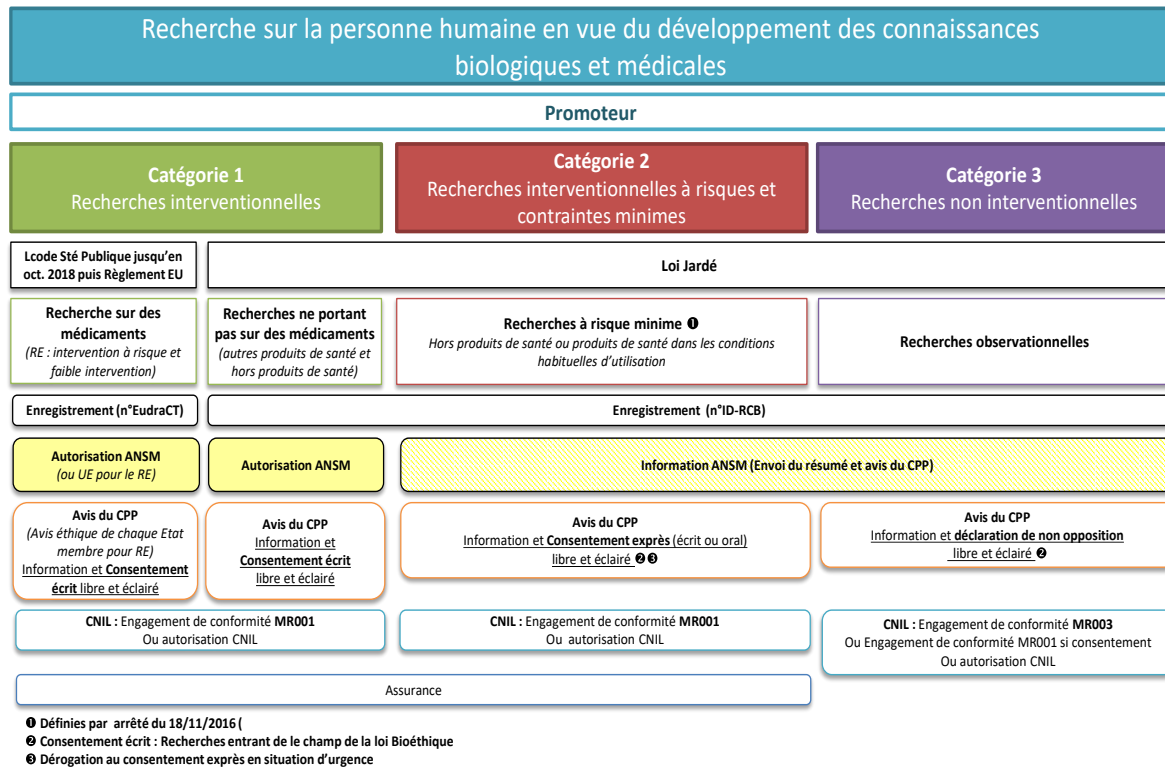


Figure 13 : Différentes catégories d'une recherche sur la personne humaine (source Inserm)

Suite à l'apparition du **décret 2016-1537** du 16 Novembre 2016 d'application de la loi n°2012-300 du 5 Mars 2012, les dénominations recherche biomédicale ou essais cliniques ont été remplacées par « recherche impliquant la personne humaine » (RIPH). Toutefois, le terme « essai clinique » est le plus souvent utilisé par le personnel hospitalier, aussi, dans la suite du document, c'est ce terme qui sera mentionné.

b) Les différentes phases d'un essai clinique

Un essai clinique est « entendu comme tout essai clinique d'un ou plusieurs médicaments visant à déterminer ou à confirmer leurs effets cliniques, pharmacologiques et les autres effets pharmacodynamiques ou à mettre en évidence tout effet indésirable, ou à en étudier l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination, dans le but de s'assurer de leur innocuité et/ou de leur efficacité » (77).

Dans un premier temps, le médicament expérimental (ME) est testé in vitro, sur des modèles cellulaires et animaux. Dans ce cas, on parle d'études précliniques. Lors du développement de la phase préclinique, les chercheurs vont optimiser la production du ME

en fixant son mode de production et sa mise en forme galénique ainsi qu'en proposant différentes techniques de contrôles des matières premières, ingrédients actifs, excipients et produits finis. Ils vont également étudier les données pharmacodynamiques, pharmacocinétiques (absorption, distribution, métabolisation, élimination) et toxicologiques (aiguë, chronique, mutagenèse, cancérogenèse) de la molécule à tester sur des modèles cellulaires et animaux. Ces études seront complétées par des données sur la toxicité du ME sur différents modèles animaux dont un rongeur. De ce point de vue, la complexité des études de toxicité animale va varier en fonction du stade d'introduction chez l'homme du ME. Ainsi, pour les essais cliniques de phase précoce, les agences acceptent que seuls les essais de toxicité aiguë chez une espèce puissent être fournis, à condition d'être dans des conditions dites de microdoses infra pharmacologiques (< 100 µg en dose unique). Il est même admis que ces études soient absentes du dossier de demande d'autorisation, lors de première administration chez l'homme sain à des fins de pharmacocinétique (essai clinique dit de phase 0). Lorsque le ME est utilisé en phase précoce à des doses supérieures à 100 µg ou lorsque la posologie utilisée est pharmacologiquement active, il peut être autorisé de réaliser les premières introductions chez l'homme sur la base d'étude de toxicité animale aiguës dites étendues. Dans ce cas, les essais vont être effectués sur 2 espèces animales dont un rongeur, sur une période de 15 jours avec des doses/kg qui excéderont celles envisagées chez l'homme. Dans les autres cas, notamment avant les essais dit de phase pilote, les études de toxicités animales complètes sont requises. Ce n'est qu'à l'issue de ce développement préclinique que, le ME va être testé sur l'homme.

Son développement clinique se déroule en quatre phases (78) :

- Phase I en cancérologie :

le ME est administré pour la première fois chez l'homme. Cette phase va permettre d'étudier le devenir de la molécule dans l'organisme, d'évaluer sa tolérance et sa toxicité. En cancérologie, il est admis que ce développement soit réalisé chez des patients compte tenu de la toxicité potentielle des produits testés. Dans ce cas, il est possible d'envisager, dès cette phase précoce d'évaluation du ME, un bénéfice pour le patient. Il convient alors de définir précisément les posologies afin qu'en début d'essai, les patients puissent bénéficier des effets pharmacologiques du ME sans que les effets toxiques soient trop importants. Le modèle dit 3 + 3 est souvent utilisé dans ce but. Il consiste à traiter 3 patients dans un premier temps et d'étudier le profil toxicologique complet obtenu avec une première dose. En cas de non toxicité, les posologies sont augmentées chez 3 nouveaux patients. Lorsqu'un

patient présente des signes de toxicité organiques pour une dose du ME, 3 nouveaux patients sont inclus avec la même posologie. Si 2 ou plus patients sur 6 présentent des signes de toxicité, la dose limite est considérée comme atteinte.

- Phase II en cancérologie :

Les effets toxiques du ME ont été définis dans la phase précédente. De façon à pouvoir évaluer ses effets thérapeutiques, le ME va être administré chez des patients parfaitement identifiés concernant leur pathologie de façon à constituer un groupe le plus homogène possible. La posologie choisie pour cette phase correspond le plus souvent au 1/10 de la dose limite tolérée définie durant la phase I. Toutefois, il est admis que cette dose puisse être modulée durant l'essai pour définir le plus précisément possible l'efficacité de la fenêtre thérapeutique du ME. Durant toute cette phase, le profil de toxicité du ME sera affiné et viendra compléter les résultats obtenus lors de la phase I.

Le promoteur des essais de phase II ne devra inclure que des patients diagnostiqués pour un seul type de cancer, ceci, même si le ME présente une efficacité de façon plus large. Il devra réaliser autant d'essais de phase II que de pathologies susceptibles d'être traitées par le ME.

- Phase III ou essai pilote en cancérologie :

Cette phase a pour but de déterminer l'efficacité du médicament. Les essais de phase III vont comparer l'efficacité du ME par rapport au traitement le plus efficace connu sur une même population de patients répartie en deux groupes. Un groupe de patients témoins qui va recevoir le traitement le plus efficace connu au moment de l'essai et un groupe de patients chez qui on administre la molécule à tester. Ces essais sont réalisés généralement sur un nombre de patients importants, calculés en fonction d'études statistiques. L'essai peut être interrompu en cours de réalisation, dès l'instant où une différence statistique significative d'efficacité thérapeutique est observée sur l'un des deux groupes. A l'issue de cette phase, le promoteur de l'essai fait une demande d'Autorisation de mise sur le marché (AMM).

- Phase IV :

Cette dernière phase dite post-AMM se déroule après commercialisation du médicament pour détecter des éventuels effets indésirables graves ou des complications lors d'une utilisation normale du médicament. Elle se déroule à long terme, et correspond à la pharmacovigilance.

c) La demande d'autorisation d'essai clinique

Selon la directive 2001/20/EC, pour obtenir l'autorisation de démarrer un essai clinique, « le promoteur ne peut démarrer un essai clinique qu'après délivrance d'un avis favorable de la part du comité d'éthique et pour autant que l'autorité compétente de l'État membre concerné n'ait pas signifié au promoteur d'objections motivées ».

En France, le comité d'éthique en place est le CPP créé par la loi 2004-806 du 9 Août 2004 visant à mettre la législation française en accord avec la directive européenne. L'**Arrêté de 2 décembre 2016** fixe le contenu et les modalités de présentation du dossier de demande d'avis au CPP qui se compose d'un dossier administratif et d'un dossier sur la recherche (79).

L'autorité compétente française est l'ANSM. Avant de faire une demande d'autorisation d'essai clinique (AEC) à l'ANSM, le demandeur doit obtenir un numéro d'identification de l'essai clinique correspondant au numéro d'enregistrement de l'essai dans la base européenne des essais cliniques de médicament, l'EudraCT. L'AEC doit ensuite être conforme aux indications de la CT-1 du 19 mai 2011 de la commission européenne (80) et doit contenir : le courrier et le formulaire de la demande d'AEC, le protocole de l'essai clinique et son résumé, la brochure de l'investigateur, le DME, l'avis du CPP, et d'autres documents le cas échéant (81).

Cette procédure de demande d'AEC est active en attendant l'application du règlement 536/2014. Toutefois, l'ANSM a mis en place une procédure expérimentale visant à se préparer au règlement 536/2014 tout en respectant la réglementation actuelle, il s'agit d'une phase pilote dont les modalités sont disponibles sur le site de l'ANSM (82).

III.2. Essai clinique et médicament radiopharmaceutique

a) La législation des médicaments radiopharmaceutiques

Depuis la loi n°92-1279 du 8 Décembre 1992, les médicaments radiopharmaceutiques, les générateurs, les trousseaux et les précurseurs sont reconnus en tant que médicament. Ils sont définis comme « tout médicament, qui lorsqu'il est prêt à l'emploi, contient un ou plusieurs radionucléides, incorporés à des fins médicales » selon la directive 2001/83/CE. Cette catégorie de médicament a une double appartenance ; elle suit la législation des médicaments dont les autorités compétentes sont l'ANSM et l'ARS et la législation des isotopes radioactifs dont les autorités compétentes sont l'Agence de sûreté nucléaire (ASN) et l'Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN).

Pour pouvoir utiliser des MRP, la PUI dont dépend la radiopharmacie doit obtenir l'autorisation de préparer des MRP tel que décrit dans l'article R5126-9 du CSP délivré par l'ARS (83). Le responsable de l'activité nucléaire doit obtenir l'autorisation de détenir, d'utiliser ou de fabriquer des sources radioactives non scellées auprès de l'ASN selon l'article R1333-104 (84).

b) Les médicaments radiopharmaceutiques expérimentaux

Un médicament radiopharmaceutique expérimental (MRPE) doit suivre la législation des MRP selon l'article L5121-1 du CSP et la législation des ME selon l'article L5121-1-1 du CSP.

On entend par médicament expérimental, selon l'article 2 de la directive 2001/20/EC « tout principe actif sous une forme pharmaceutique ou placebo expérimenté ou utilisé comme référence dans une recherche biomédicale, y compris les médicaments bénéficiant déjà d'une autorisation de mise sur le marché, mais utilisés ou présentés ou conditionnés différemment de la spécialité autorisée, ou utilisés pour une indication non autorisée ou en vue d'obtenir de plus amples informations sur la forme de la spécialité autorisée » (85). En plus de l'autorisation de préparer des MRP, la radiopharmacie doit détenir l'autorisation de préparer des ME selon l'article R5126-9 du CSP. Le responsable de l'activité nucléaire doit aussi faire une demande d'autorisation de détenir et d'utiliser des substances radioactives dans le cadre de la recherche auprès de l'ASN (article R1333-13 du CSP) (86). Toutefois, cette autorisation peut être associée à l'autorisation globale chaque fois que le centre est labellisé CLIP-2 (centre labellisé d'investigation de phase précoce). Suite à cette autorisation, l'IRSN

va lui fournir un document de traçabilité nommé « bon IRSN » spécifique de l'essai clinique et qui va permettre d'informer tous les mouvements de sources radioactives opérés dans le cadre de l'essai, codifié par le numéro 015.

Les éléments nécessaires pour être autorisé à utiliser des MRP dans le cadre d'un essai clinique sont regroupés dans le **Tableau 13**.

Demande à formuler	Délivré par
<i>Législation du médicament</i>	
N° EudraCT	Base de données européenne
Avis du comité d'éthique	CPP
Demande d'autorisation d'essai clinique	ANSM
Autorisation de préparer des médicaments radiopharmaceutiques	ARS
Autorisation de préparer des médicaments expérimentaux	ARS
<i>Législation des rayonnements ionisants</i>	
Autorisation de détenir, utiliser ou de fabriquer des sources radioactives non scellées	ASN
Autorisation de détenir, utiliser ou de fabriquer des sources radioactives non scellées dans le cadre d'un essai clinique	ASN
Demande d'enregistrement d'acquisition de radionucléides en source non scellée pour un essai clinique	IRSN

Tableau 13 : Ensemble des procédures à formuler pour un essai clinique en radiopharmacie

III.3. Qu'est-ce que le dossier du médicament expérimental ?

La commission européenne de 2010 précise que le DME est un document qui rassemble les informations sur la qualité de tout ME : sa fabrication, ses contrôles ainsi que les données non cliniques et cliniques. Il fait partie des documents à transmettre lors de la demande d'AEC auprès de l'ANSM, et doit être complété pour chaque médicament expérimental sauf dans le cas où le ME dispose d'une AMM.

Ce document est divisé en 3 parties (**Annexe 2**) :

- Partie 1 : concentre les données relatives à la qualité pharmaceutique, chimique et biologique.
- Partie 2 : regroupe les données non cliniques (pharmacologie, pharmacocinétique et toxicologie)
- Partie 3 : réunie les données cliniques (rapport d'études de pharmacocinétique, de pharmacodynamie, d'efficacité et de sécurité)

Dans le cadre de notre projet, seule la partie 1 concerne la radiopharmacie et sera donc développée dans ce mémoire.

III.4. Les données relatives à la qualité pharmaceutique, chimique et biologique : partie 1 du DME

Selon la commission européenne de 2010, les données sur la qualité du ME doivent suivre le « Guideline on the requirements to the chemical and pharmaceutical quality documentation concerning investigational medicinal products in clinical trials » disponible dans le volume 10 « The rules governing medicinal products in the European Union » de l'European medicines agency (EMA), l'EudraLex (87). Elle se compose d'une partie sur la substance active et autres ingrédients qui rentrent dans la composition du produit fini ainsi que leurs impuretés associées et d'une partie sur le produit fini.

a) Les substances actives ou ingrédients actifs (API)

En dehors du [68Ga], elles sont fournies, dans le cadre de notre étude, par une société industrielle avec des certificats d'analyse et un statut « Full GMP ». Cette partie du DME a donc été construite en fonction des documents donnés par cette société et sous son contrôle.

Pour ce qui concerne le radionucléide, il est obtenu à partir d'un générateur avec AMM, et le résumé des caractéristiques du produit (RCP) a été reporté en annexe du DME à titre d'information complémentaire.

Dans le cadre de notre projet, deux substances actives sont utilisées : la molécule que l'on souhaite radiomarquer, le Pentixafor, et le [68Ga]. Les informations que l'on doit retrouver dans la partie 3.2.S du DME sont décrites ci-dessous :

- Informations générales :

sont détaillées ici la nomenclature de la molécule utilisée, sa structure chimique ainsi que ses propriétés physico-chimiques (solubilité, densité, pKa...).

- Fabrication :

la liste des fabricants, leurs contacts et leurs responsabilités doivent être renseignés ici. Y figure aussi la description des procédés de fabrication de la molécule, c'est-à-dire toutes les étapes de synthèse ainsi que les contrôles effectués au cours de la synthèse. Les matières premières, leur origine et impuretés associées doivent également être contrôlées et les méthodes de contrôle décrites.

- Caractérisation :

il s'agit de décrire la structure de la molécule et les techniques de détection utilisées. Les impuretés potentielles, issues de dégradation ou de solvants résiduels, lors de la synthèse sont regroupées ici.

- Contrôle de la substance active :

cette partie précise les spécifications attendues pour le contrôle de la substance active. Toutes les procédures analytiques de contrôle (HPLC, CPG, microbiologie...) doivent être décrites et validées. Les résultats des analyses des différents lots sont présentés et les spécifications y sont justifiées.

- Étalons et substances de référence : les informations sur les étalons utilisés pour comparaison doivent être précisées.

- Système de fermeture du conditionnement :

tous les emballages et matériaux utilisés pour le conditionnement de la substance doivent être présentés et justifiés (certificat d'analyse).

- Stabilité :

une étude de stabilité de la substance doit être réalisée pour garantir son utilisation. Toutes les méthodes utilisées et les résultats doivent y figurer.

b) Le produit fini

Le produit fini obtenu est, dans notre cas, le [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor. Cette partie a été rédigée par l'équipe de la radiopharmacie. Les éléments que l'on doit retrouver dans la partie 3.2.P du DME sont les suivants :

- Description et composition du produit fini :

sont précisés ici la composition finale du produit radiomarqué (quantité, activité, volume...).

- Développement pharmaceutique :

cette partie regroupe les composants utilisés lors du marquage (vecteur, radionucléide, excipient...), décrit le développement de la formulation et du procédé de fabrication, précise le contenant final de la solution ainsi que la stérilité et la compatibilité du produit. On peut y trouver par exemple les résultats des essais de marquage réalisés lors du développement.

- Fabrication :

pour la fabrication, les responsables de la synthèse, la composition finale, le procédé de fabrication, les contrôles des étapes et la validation du procédé doivent être mentionnés.

- Contrôle des excipients : les excipients présents doivent être contrôlés.

- Contrôle du produit fini :

la solution finale doit être contrôlée selon la monographie de la pharmacopée européenne (identification et détermination du produit, des impuretés, stérilité, pH...). Les méthodes de contrôle et les limites doivent être précisées et les méthodes validées.

- Étalons et substances de référence : les informations sur les étalons utilisés pour comparaison doivent être précisées.

- Système de fermeture du conditionnement : tous les emballages et matériaux utilisés pour le conditionnement de la substance doivent être présentés et justifiés (certificat d'analyse).

- Stabilité : une étude de stabilité de la substance doit être réalisée basée sur la période radioactive du radioélément.

Partie II : Développement du [68Ga]Ga- DOTA-Pentixafor

I. Présentation

Afin de rédiger la partie 1 du DME, il a fallu mettre au point le radiomarquage et valider les méthodes de contrôle du [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor. Après une phase de mise au point qui a servi à définir les paramètres optimaux de radiomarquage de la molécule, la validation du radiomarquage du Pentixafor au [68Ga] a été effectuée sur 3 lots consécutifs dans des conditions de bonnes pratiques de fabrication hospitalière. La validation de la méthode de contrôle par chromatographie liquide haute performance (HPLC) a aussi été mise au point pour ce radiopharmaceutique et a été validée afin de connaître sa répétabilité, sa spécificité, sa limite de détection ainsi que sa linéarité dans les domaines de concentration usuels. Les résultats de ces travaux sont présentés dans cette partie.

II. Matériel pour le radiomarquage

II.1. Matériels et réactifs de synthèse :

a) Le peptide

Le DOTA-Pentixafor est fourni en qualité « GMP » par la société ABX GmbH avec son certificat d'analyse. Un flacon mère est constitué de 250 µg de peptide sous forme de lyophilisat. Chaque flacon mère est reconstitué de façon stérile avec 1 mL d'eau pour préparation injectable (eau PPI). La solution obtenue est alors fractionnée stérilement en aliquots de 200 µL (50µg) et ces derniers sont référencés puis stockés à – 20°C jusqu'à leur utilisation. Compte tenu du faible nombre d'aliquots générés, seul deux d'entre eux ont été retenus comme échantillons témoins. Le premier a servi pour des études de stabilité, le second pour réaliser un standard interne lors des contrôles par HPLC. Ces échantillons de lot ont été conservés au réfrigérateur entre 4 et 8°C.

b) Le générateur de Germanium-68/Gallium-68

Le [68Ga] est obtenu à partir d'un générateur [68Ge]/[68Ga] Galliapharm® de la société Eckert & Ziegler de qualité pharmaceutique et calibré à 1 850 MBq au 25/12/2019. L'élution est réalisée avec une solution stérile d'HCl 0,1 M ultra-pure de qualité GMP (**Figure 18**).

c) *L'automate de synthèse, les consommables et réactifs*

La synthèse est réalisée sur un automate de synthèse Modular-Lab de chez Eckert & Ziegler situé dans une enceinte blindée haute énergie et pilotée avec le système Modular-Lab PharmTracer. L'automate est équipé d'un réacteur, de vannes où l'on connecte la cassette, d'un pousse seringue et de détecteurs de radioactivité situés au niveau du réacteur, de la colonne de prépurification de l'éluat et de la colonne de purification du produit fini qui permettent de suivre en temps réel les transferts d'activité lors de la synthèse.

Pour chaque marquage, une cassette stérile à usage unique est utilisée. Ces cassettes sont fournies par la société Eckert & Ziegler et certifiées GMP. Chaque cassette (**Figure 14**) est composée : une colonne échangeuse de cations du type SCX (Elchrom SCX silica), une colonne chromatographique SEP-PAK C18, de tubulure, un flacon de réaction (ou réacteur), un flacon pour contenir l'éluant et une seringue de prélèvement. Deux sachets d'accessoires sont associés : un contenant le flacon stérile pour récupérer le produit final, un filtre de 0,22 μm , 2 seringues de 10 mL, 2 prises d'air, 2 seringues de 1 mL, une aiguille hypodermique 20Gx70mm et une aiguille hypodermique 20Gx40mm ; l'autre contenant : 2 flacons vides, un flacon poubelle, 2 seringues de 3 mL et une prise d'air.

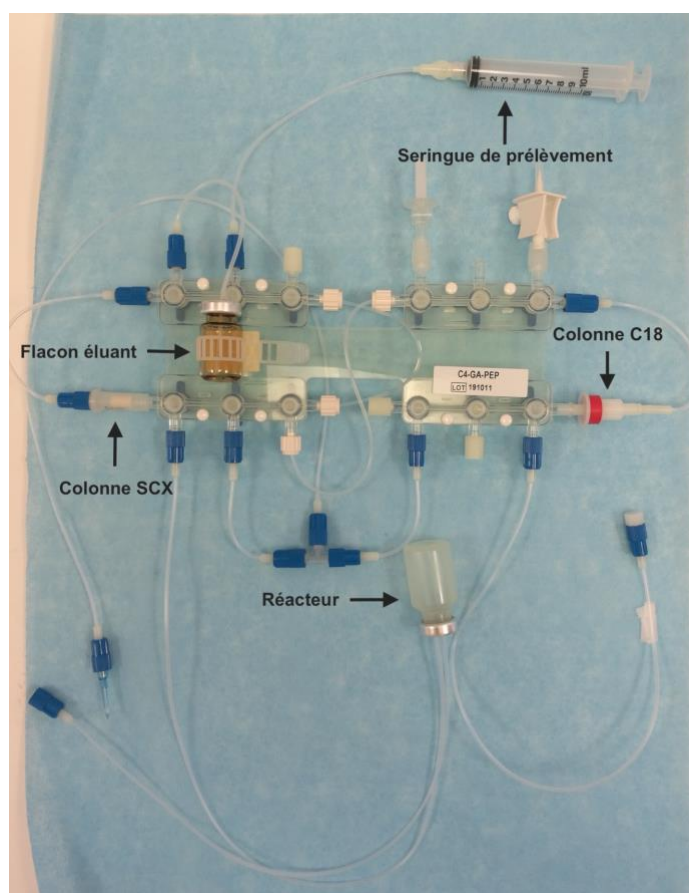


Figure 14 : Photographie d'une cassette de synthèse

Un kit de réactifs est également utilisé pour chaque marquage (**Figure 15**). Ces kits sont fournis par la société ABX et certifiés GMP. Un kit se compose : d'un flacon d'HCl / NaCl (flacon 1), d'un flacon d'acide acétique (flacon 2A), d'un flacon d'acétate trihydraté en poudre (flacon 2), d'un flacon d'eau ultra-pure (flacon 2B), d'un flacon d'éthanol / eau 1:1 (flacon 3) et d'un flacon de solution saline isotonique 0,9% (flacon 4). Afin d'obtenir un tampon acétate nécessaire pour un radiomarquage reproductible, le mode opératoire décrit dans la **Figure 16** doit être respecté scrupuleusement. En effet, les volumes d'acide acétique à ajouter sur l'acétate permettent de fixer le pH final de la solution selon la formule :

$$pH = pKa + \log \frac{B}{A}$$

De même, le volume d'eau ajouté au final permet de moduler la molarité en acétate de la solution. Après reconstitution, le flacon 2B contient 4,4 mL de tampon acétate 0,5 M pH= 4,53. Le kit se compose aussi des seringues à usage unique et de spikes pour la préparation des réactifs.



Figure 15 : Illustration d'un kit de réactifs

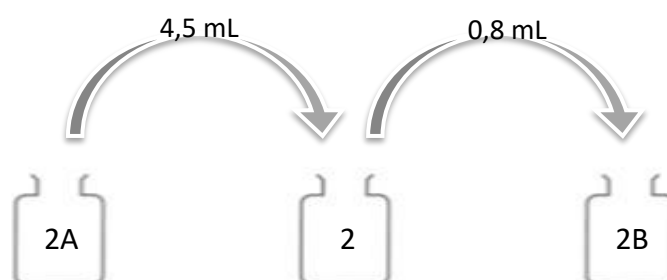


Figure 16 : Préparation du flacon de tampon acétate

II.2. Matériels et réactifs de contrôle

a) Analyses chromatographiques

Les analyses chromatographiques sont réalisées selon deux techniques : l'HPLC et la chromatographie sur couche mince (CCM).

- Analyse HPLC :

L'analyse HPLC a été réalisée sur des systèmes Shimadzu et Agilent (société Elysia Raytest, Belgique) couplés à un détecteur UV/visible (lampe au deutérium) et à un radiodétecteur de type scintillateur solide NaI. La colonne chromatographique utilisée est une colonne ACE® C18 en phase inverse 150 x 3 mm, de porosité 3 µm. Les deux phases mobiles utilisées sont un mélange d'acétonitrile (ACN) et d'acide trifluoroacétique (TFA) (99,9 : 0,01 V/V) (solvant A) et un mélange d'eau et de TFA (99,9 : 0,01 V/V) (solvant B). Le débit de l'élution est de 0,5 mL/min sous un gradient binaire des phases mobiles selon la méthode employée par Poschenrieder et al (88). Le programme du gradient de solvant est détaillé dans le **Tableau 14** et la **Figure 17**. Les logiciels Gina X et Shimadzu permettent le pilotage et l'analyse des résultats.

Temps d'analyse	Solvant A	Solvant B
0 – 0,5 min	5 %	95 %
0,51 min	30 %	70 %
15,50 min	55 %	45 %
15,51 – 21 min	95 %	5 %

Tableau 14 : Programme du gradient des solvants HPLC



Figure 17 : Graphique du gradient des solvants HPLC

- Analyse CCM :

La phase stationnaire pour réaliser la CCM est un papier chromatographique imprégné d'un gel de silice de type iTLC-SG (Instant Thin Layer Chromatography-Silica Gel) de dimension : 10 x 1 cm. Les deux phases mobiles pour contrôler le produit fini sont un solvant de citrate 0,1M et un mélange d'acétate d'ammonium 1M et de méthanol 1M (50/50). Après migration des solvants, les bandelettes sont analysées avec un radiochromatographe MiniGita (Raytest).

b) Détermination de la pureté radionucléidique

La pureté radionucléidique est déterminée avec un activimètre CRC-55tR® de la société Capintec (contrôle de l'activimètre quotidiennement avec une source de Baryum 133) et un compteur gamma Wizard® 2480 de la société Perkin Elmer avec efficacité de comptage de 49,8%.

c) Détermination du pH

La mesure du pH du tampon acétate lors de la mise au point du radiomarquage a été déterminée avec un pH mètre Lab 850 de chez Schott instrument et dont le pH du standard est de 4,005. Les mesures du pH des lots de validation sont effectuées sur des bandelettes indicatrices de pH de type MQuant® (pH : 0 – 6) de la société Merck.

d) Détermination des endotoxines

La détermination des endotoxines est faite grâce au système de test Endosafe® nexgen-PTS (Charles River) par la méthodologie cinétique LAL avec une cartouche d'une sensibilité de 5-0,05 EU/mL.

III. Méthode

III.1. La synthèse du [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor

a) Les étapes de synthèse

- Étapes manuelles :
 - *Le conditionnement de la cassette de synthèse*

Certaines étapes manuelles sont réalisées dans un environnement de classe A, avant de lancer la synthèse automatisée. Au moyen d'un cathéter en plastique, 3 mL d'éluent HCl (0,25M) /NaCl sont introduits dans le flacon éluant et 2,2 mL de tampon acétate (0,5M pH 4,53), 50 µg (200 µL) de peptide et 0,4 mL d'éthanol/eau (1:1) sont introduits dans le réacteur. Toutes les connectiques de la cassette sont vérifiées afin de limiter les risques de fuite lors de la synthèse.

- *L'adaptation de la cassette sur l'automate*

Une fois la cassette conditionnée, elle est adaptée comme suit sur l'automate : la cassette est connectée sur les vannes de l'automate de synthèse de façon stérile. L'arrivée d'azote est connectée à la vanne CMB-SM2 de la cassette. La tubulure d'entrée du générateur est connectée à la poche d'HCl 0,1 M et la tubulure de sortie du générateur à la vanne CMA-SM3 de la cassette. Le flacon de NaCl 0,9% et le flacon éthanol/eau (1:1) sont connectés à leur emplacement respectif. Le flacon du produit fini est connecté au filtre de 0,22 µm, lui-même connecté à la tubulure en sortie de C18. La poubelle est connectée aux tubulures correspondantes (**Figure 18**).

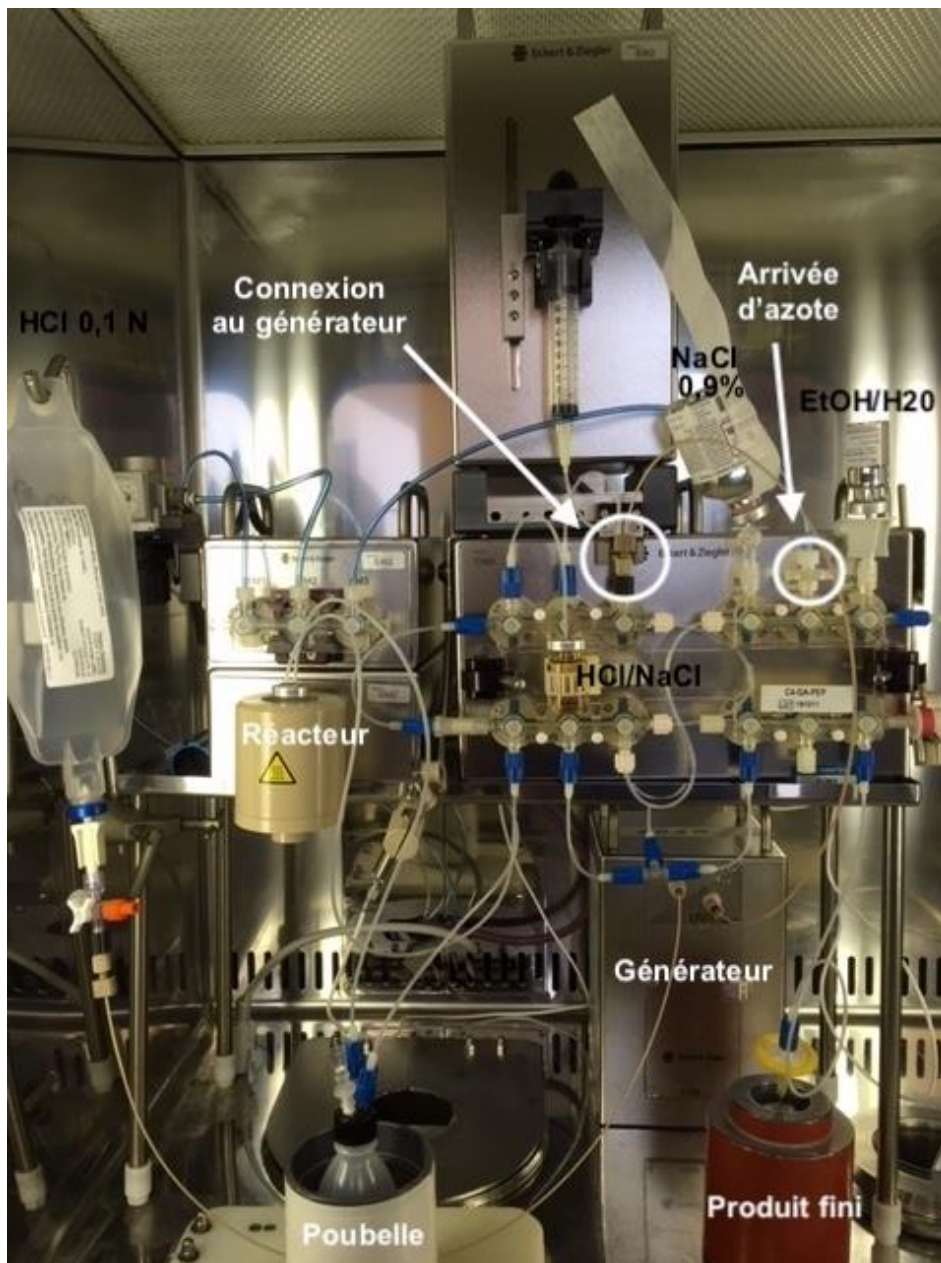


Figure 18 : Montage de la cassette et connexion sur l'automate de synthèse

- **Étapes automatisées : Annexe 3**

Avant de débiter l'élution, toutes les tubulures de la cassette sont rincées avec du NaCl 0,9% et la colonne C18 est conditionnée par 5 mL d'éthanol/eau (1:1) puis asséchée avec de l'azote filtré sur 0,22 µm puis rincée avec du NaCl 0,9%. Un test de maintien sous pression de 2 bars d'azote permet de vérifier les défauts de serrage des points de connexion de la cassette à l'automate.

1. **Élution du générateur** :

le générateur est élué avec 6 mL d'une solution d'HCl 0,1 M pour obtenir du $[68\text{Ga}]^{3+}$

2. **Pré-purification** :

l'éluat passe au travers de la colonne SCX qui retient le gallium libre sous forme d'ions $[68\text{Ga}]^{3+}$. Cette étape permet d'éliminer les traces de métaux contaminants présents dans l'éluat et qui pourraient se complexer avec le DOTA. Pour décrocher le $[68\text{Ga}]$ de la SCX, elle est éluée avec 1 mL d'HCl (0,25M) / NaCl, le $[68\text{Ga}]^{3+}$ se transforme instantanément en $[68\text{Ga}]\text{Cl}^4$ qui se désorbe de la colonne et est transféré dans le réacteur.

3. **Radiomarquage** :

le réacteur contient donc 2,2 mL de tampon acétate 0,5M pH 4,53 ; 1 mL d'HCl (0,25M) / NaCl contenant le gallium ; 0,4 mL d'éthanol / eau et 200µL de DOTA-Pentixafor. L'ajout des 1mL d'HCl / NaCl a diminué le pH de la solution tampon qui est de 4,3. La réaction de radiomarquage entre le DOTA-Pentixafor et le $[68\text{Ga}]$ va durer 10 minutes à 95°C. Le réacteur est ensuite refroidi avec du NaCl 0,9%.

4. **Purification** :

a) après les étapes de synthèse et de refroidissement, la solution du milieu réactionnel est transférée vers la colonne C18 et va être retenue par celle-ci. Cette étape de purification permet d'éliminer le gallium libre non complexé au peptide vers la poubelle qui n'a pas d'affinité pour la C18. Le gallium hydrolysé est quant à lui insoluble dans l'eau et reste bloqué sur le fritté d'entrée de la colonne.

b) le produit fini est ensuite décroché de la C18 par 2 mL d'éthanol / eau (1:1).

5. **Filtration stérilisante** :

la dernière étape consiste à stériliser le produit fini au travers du filtre de 0,22 µm. Le $[68\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-Pentixafor}$ est recueilli dans le flacon final puis dilué avec 10 mL de NaCl

0,9% (ce qui abaisse encore d'avantage le pH de la solution). Au total, la synthèse dure une trentaine de minutes.

Le produit fini consiste en une solution limpide et stérile de [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor en solution dans un mélange de sérum physiologique / d'éthanol 11 :1.

b) Contrôle des étapes de synthèse

L'ensemble des actions d'ouverture et de fermeture des vannes qui contrôlent la circulation des fluides au sein de la cassette durant les synthèses est enregistré dans la base de données selon les recommandations décrites dans les guidelines de référence. D'autre part, les suivis en continu des températures du réacteur ainsi que de la localisation de la radioactivité au sein de la cassette sont également enregistrés et résumés sous forme de graphique dans le batch report. La traçabilité complète des opérations permet de répondre aux exigences des bonnes pratiques de synthèse automatisée. De plus, ce suivi informatisé de synthèse permet de repérer très rapidement les incidents et éventuellement d'y pallier. Par exemple, si lors de l'étape de purification sur la C18, le détecteur ne relève pas d'activité, cela veut dire que la complexation entre le DOTA-Pentixafor et le [68Ga] n'a pas fonctionné et que tout le gallium s'est retrouvé dans la poubelle.

En fin de synthèse, un test d'intégrité du filtre stérilisant est réalisé sur la cassette en place. Pour vérifier que le filtre n'a pas été endommagé lors de l'étape de stérilisation, la cassette est maintenant sous 2 bars de pression pendant 1 min, puis l'entrée d'azote est fermée et en cas d'intégrité du filtre, la pression au sein de la cassette doit se maintenir supérieure à 1 bar pendant environ 1 min. Ce test, non conforme à la pharmacopée, est cependant admis comme équivalent par les agences lorsqu'il s'agit de radiopharmaceutiques car il permet d'éviter les irradiations inutiles des personnels. Ce contrôle est essentiel pour la validation de la synthèse et la libération du lot de production.

III.2. Contrôles du produit fini

a) Identification du [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor et détermination de la pureté radiochimique par méthode HPLC

Le contrôle est réalisé sur un échantillon de 20 µL de la solution finale introduit dans la boucle de l'HPLC. Le détecteur UV est réglé à 220 nm. Le détecteur radioactif permet de détecter une gamme d'énergie très large.

Les pics UV et radioactif correspondant au [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor sont visualisés sur des chromatogrammes. Les temps de rétention (Tr) (UV et radioactif) du [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor doivent correspondre à +/- 10% du temps de rétention d'une solution de référence de DOTA-Pentaxifor (Tr_{ref}). Pour les lots de validation, la solution de DOTA-Pentixafor (froide) utilisée pour le radiomarquage est analysée par méthode HPLC pour obtenir le Tr_{ref} .

L'intégration du ou des pic(s) obtenu(s) lors de l'analyse avec le radiodétecteur permet de déterminer la PRC de la solution.

b) Validation de la méthode analytique HPLC

La méthode d'analyse a été validée en déterminant la répétabilité, la spécificité, la linéarité et la limite de détection de l'appareil pour le détecteur UV et le radiodétecteur selon les recommandations de l'ICH (89).

- Répétabilité :

- *Détecteur UV* :

la répétabilité du radiodétecteur est déterminée en injectant à plusieurs reprises une solution de DOTA-Pentixafor. Les coefficients de variation des temps de rétention de la solution doivent être inférieurs à 10%.

- *Radiodétecteur* :

la répétabilité du radiodétecteur est déterminée en injectant à plusieurs reprises une solution de [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor. Les coefficients de variation des temps de rétention de la solution doivent être inférieurs à 10%.

- Spécificité :

Pour déterminer la spécificité, le temps de rétention de notre peptide a été obtenu en analysant 3 fois une solution de référence de DOTA-Pentixafor (non radiomarquée). Ce temps de rétention a été comparé au temps de rétention d'une solution de [68Ga]Ga-DOXA-Pentixafor et de [68Ga] libre (analysée 3 fois aussi). Dans les conditions expérimentales de notre appareil, les temps de rétention des pics de DOTA-Pentixafor et de [68Ga]Ga-DOXA-Pentixafor doivent être similaires.

- Linéarité :

- *Détecteur UV* :

la linéarité du détecteur UV est déterminée en injectant une gamme de concentration d'une solution de DOTA-Pentixafor de 5 µg/mL à 125 µg/mL à 220 et 254nm. La relation linéaire entre l'aire sous la courbe du pic chromatographique et la concentration de la solution est démontrée par régression linéaire. Le coefficient de corrélation (R^2) de la droite doit être > 0,99.

- *Radiodétecteur* :

la linéarité du radiodétecteur a été déterminée en injectant une activité théorique calculée de gallium libre à différents temps à partir de la mesure d'un flacon d'élution de gallium. La relation linéaire entre l'aire sous la courbe du pic chromatographique et l'activité injectée de la solution est démontrée par régression linéaire. Le coefficient de corrélation R^2 de la droite doit être > 0,99.

- Limite de détection :

La limite de détection est déterminée grâce à la gamme de concentration utilisée pour déterminer la linéarité.

c) Détermination de la pureté radiochimique par méthode CCM

La pureté radiochimique est déterminée par migration d'une goutte de la solution finale de [68Ga]Ga-DOXA-Pentixafor sur deux bandelettes d'iTLC-SG, l'une éluée par du citrate 0,1M et l'autre éluée par le mélange acétate d'ammonium 1M / méthanol 1M (1:1). Les bandelettes sont ensuite révélées par le radiochromatographe. Lors de la lecture de la bandelette éluée par le citrate, le [68Ga]Ga-DOXA-Pentixafor ne migre pas, son rapport frontal (R_f) est compris entre 0 et 0,2 ; les impuretés révélées avec ce solvant sont les ions

Ga^{3+} qui, eux, migrent sur la bandelette et dont le R_f est compris entre 0,8 et 1. Avec le mélange ammonium / méthanol, le $[68\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-Pentixafor migre sur la bandelette et son R_f est compris entre 0,8 et 1 ; les impuretés révélées, quant à elles, sont le Ga^{3+} libre et le gallium hydrolysé qui ne migrent pas et dont le R_f est compris entre 0 et 0,1. La complémentarité d'effectuer ces deux CCM permet de déterminer la PRC du $[68\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-Pentixafor qui doit être $> 95 \%$ et dont le pourcentage d'impureté en gallium hydrolysé doit être $< 3 \%$.

d) Détermination du pH

Le pH est déterminé en déposant une goutte de la solution finale de $[68\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-Pentixafor sur une bandelette indicatrice de pH. La coloration obtenue est ensuite comparée au référentiel colorimétrique. La valeur de pH obtenue doit être comprise entre 3,5 et 8.

e) Détermination des endotoxines

Le test des endotoxines bactériennes est réalisé par la quantification des endotoxines produites par des bactéries Gram – au moyen d'un lysat d'améboocytes de limule qui a la propriété de coaguler en présence de faibles quantités d'endotoxines. Le système commercialisé sous le nom d'Endosafe a été utilisé pour ce dosage, comme décrit dans la pharmacopée européenne 01/2018:20614 (90). Un volume de 0,1 mL de la solution finale de $[68\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-Pentixafor est prélevé puis dilué au 1/100^{ème} dans de l'eau dépourvue de pyrogène. Au vu de la sensibilité de la cartouche (5-0,05 EU/mL), cette dilution au 1/100^{ème} nous permet de détecter présence d'endotoxines entre 5 et 500 EU/mL. Puis 25 μL de cette dilution sont placés dans les puits de l'appareil qui donne un résultat en 15 minutes. D'après la pharmacopée, le taux d'endotoxines de la solution finale doit être $< 175 \text{ EU/V}$. Le volume final de notre solution étant environ de 12 mL, le nombre limite d'endotoxine accepté est de 14,58 EU soit 15 EU/mL. La sensibilité de notre appareil nous permet de réaliser ce dosage.

f) Identification radionucléidique du Gallium-68

L'identification radionucléidique du $[68\text{Ga}]$ est réalisée par détermination de la période physique radioactive du gallium-68 comme décrit dans la Ph. Eur. 07/2013 : 2464 (91) en effectuant plus de trois mesures de l'activité d'un échantillon dans les mêmes conditions géométriques et sur plus de 15min. La valeur de la période physique doit être comprise entre 62 à 74 minutes. Dans notre cas, une série de mesure de l'activité d'un échantillon de

la solution finale de [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor a été effectuée sur deux heures, ce qui a permis de calculer la période physique. Les mesures ont été effectuées avec un flacon d'échantillon laissé en place dans l'activimètre durant toute la durée du test ce qui permet de nous affranchir des problèmes de géométrie de comptage.

g) Détermination de la pureté radionucléidique

La détermination de la pureté radionucléidique consiste à quantifier les traces résiduelles de [68Ge] dans la solution finale de [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor. Pour cela, une mesure à l'activimètre d'un échantillon de la solution finale est effectuée à la fin de la synthèse puis ce même échantillon est remesuré au compteur gamma 48h après décroissance radioactive du [68Ga]. Le taux de [68Ge] doit être < 0,001 % de l'activité totale.

h) Stérilité

Les tests de stérilité ont été effectués après décroissance totale d'échantillons issus de la solution finale. L'IRCNA n'étant pas équipé pour réaliser ce test, les échantillons ont été envoyés vers une société extérieure qui doit respecter la norme de la pharmacopée Monographie pharmacopée 20601. Aucun micro-organisme ne doit être retrouvé.

i) Détermination de la concentration en éthanol

La détermination de la quantité d'éthanol dans la solution finale est mesurée par chromatographie gazeuse. L'IRCNA n'étant pas équipé pour réaliser ce contrôle, nous avons envoyé nos échantillons après décroissance sur le site d'ARRONAX. La détermination de la concentration d'éthanol n'est effectuée que sur les lots de validation et ne sera mis en place en routine. Cette concentration ne doit pas dépasser 10 % du volume final de la solution.

III.3. Étude de stabilité

En raison de la courte demi-vie du [68Ga] ($T_{1/2 \text{ vie}} = 68\text{min}$), la stabilité de la solution finale de [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor a été étudiée sur 2h. L'identification du [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor et des impuretés radioactives (Ga^{3+}) par HPLC, la détermination de la pureté radiochimique par CCM, le pH et les caractères organoleptiques ont été réalisés à la fin de la synthèse (T0) et aux temps T+1h et T+2h.

IV. Résultats

IV.1. Synthèse

a) Le [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor

Les résultats sont regroupés et présentés ci-dessous dans le **Tableau 15** :

Lot	Lot 1	Lot 2	Lot 3
<i>Caractères organoleptiques</i>	Limpide et sans particules		
<i>Volume final</i>	10 – 12 mL		
<i>Activité mesurée du produit fini</i>	758 MBq	740 MBq	802 MBq
<i>Rendement de synthèse</i>	92,3 %	94,1 %	92,1 %

Tableau 15 : Résultats de la synthèse du [68Ga]-DOTA-Pentixafor

b) Contrôles des étapes de synthèse

Le test d'intégrité du filtre est conforme à la spécification pour l'ensemble des 3 lots de validation (**Figure 19**).

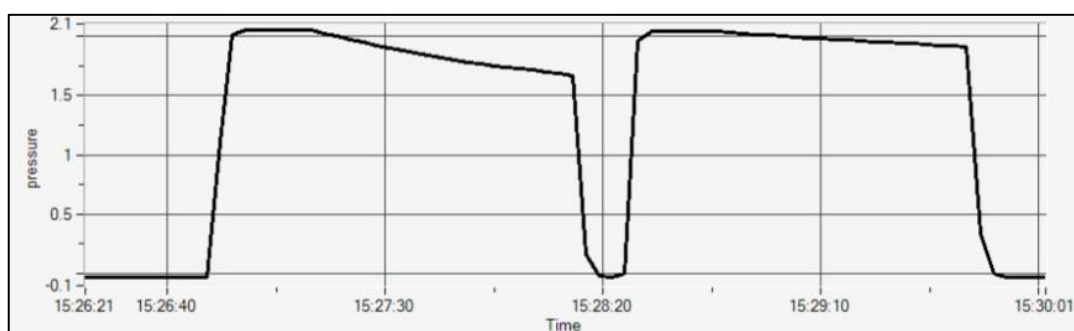


Figure 19 : Graphique représentant le test d'intégrité du filtre

Les relevés de température des 3 lots de validation montrent que les trois radiomarquages ont été réalisés à 95°C pendant 10 min. L'enregistrement de la courbe de température lors d'un marquage est obtenu dans le rapport de synthèse et est représenté en **Figure 20**.

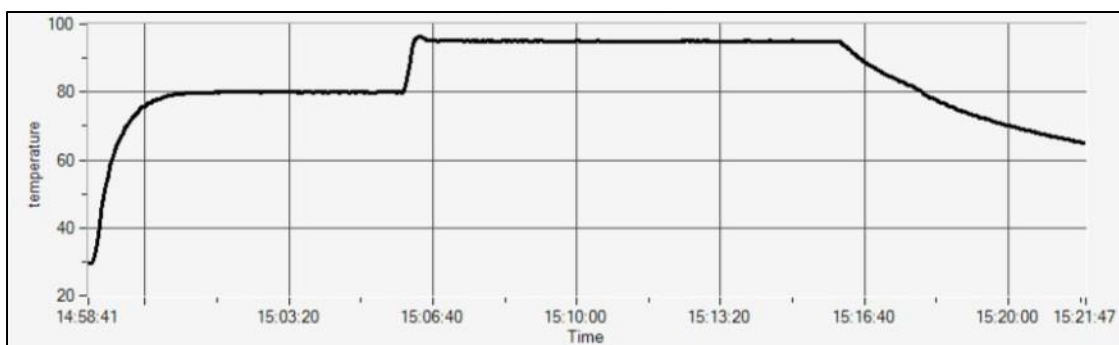


Figure 20 : Graphique représentant un relevé de température dans le réacteur lors d'un marquage

IV.2. Validation de la méthode analytique HPLC :

a) Répétabilité

- Détecteur UV : la moyenne des différents temps de rétention obtenus lors des différentes injections de DOTA-Pentixafor est de $8,36 \pm 0,14$ min, le coefficient de variation correspondant est de 0,87 %. Cette valeur est inférieure à 10 %. La répétabilité est validée.
- Radiodétecteur : la moyenne des différents temps de rétention obtenus lors des différentes injections de $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DO}TA\text{-Pentixafor}$ est de $8,53 \pm 0,09$ min, le coefficient de variation correspondant est de 0,54 %. Cette valeur est inférieure à 10 %. La répétabilité est validée.

b) Spécificité

- Détecteur UV : les temps de rétention de la solution de DOTA-Pentixafor (froide) sont respectivement à 8,40 min ; 8,28 min et 8,27 min et sans autre pic chromatographique. On en déduit un temps de rétention moyen de 8,32 min dans ces conditions expérimentales. Les chromatogrammes UV obtenus sont présentés dans la **Figure 21**.

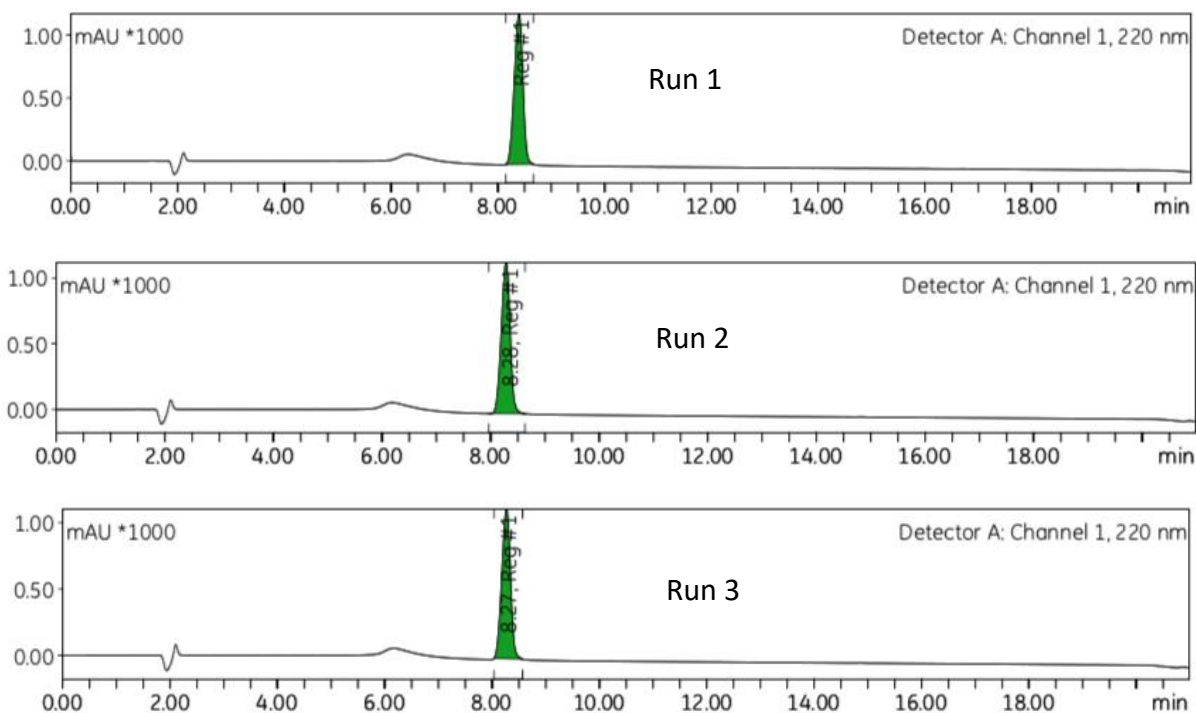


Figure 21 : Chromatogrammes UV de la solution de référence de DOTA-Pentixafor

Si l'on compare ce résultat à celui obtenu dans la partie répétabilité, le temps de rétention spécifique du DOTA-Pentixafor est affiné à $8,36 \pm 0,14$ min.

- Radiodétecteur : les temps de rétention de la solution de $[68\text{Ga}]\text{Ga-DO}TA\text{-Pentixafor}$ et de $[68\text{Ga}]$ libre et les radiochromatogrammes à l'issue des 3 injections sont regroupés respectivement dans le **Tableau 16** et la **Figure 22**. On en déduit un temps de rétention moyen pour le $[68\text{Ga}]\text{Ga-DO}TA\text{-Pentixafor}$ de 8,55 min dans ces conditions expérimentales.

Run	Run 1	Run 2	Run 3
$[68\text{Ga}]\text{Ga-DO}TA\text{-Pentixafor}$	8,50 min	8,57 min	8,57 min
$[68\text{Ga}]$ libre	1,63 min	1,63 min	1,65 min

Tableau 16 : Temps de rétention obtenus pour la spécificité de la méthode HPLC

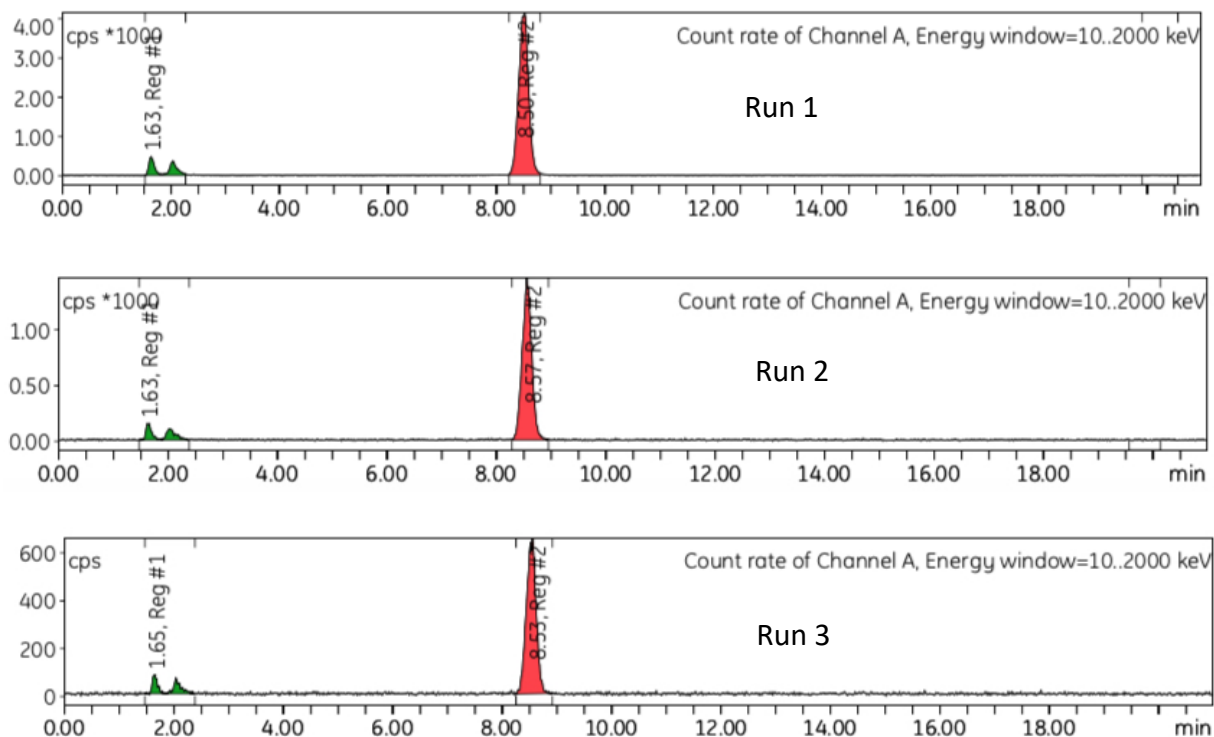


Figure 22 : Radiochromatogrammes du mélange $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-Pentixafor et $[^{68}\text{Ga}]$ libre

Par rapport aux résultats présentés, dans la partie répétabilité, qui montrent un résultat à 8,55 min, le temps de rétention spécifique du Pentixafor est affiné à $8,53 \pm 0,09$ min.

On en déduit que les Tr du DOTA-Pentixafor et du $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-Pentixafor sont presque similaires. La légère différence de temps s'explique par le montage en série des deux détecteurs.

c) Linéarité

- Détecteur UV : la **Figure 23** représente les aires sous la courbe des pics obtenus en fonction des différentes concentrations de la solution de DOTA-Pentixafor. Les coefficients de corrélation pour les longueurs d'onde 220 nm et 254 nm sont respectivement de 0,9907 et 0,9911. La linéarité de la méthode UV est conforme.

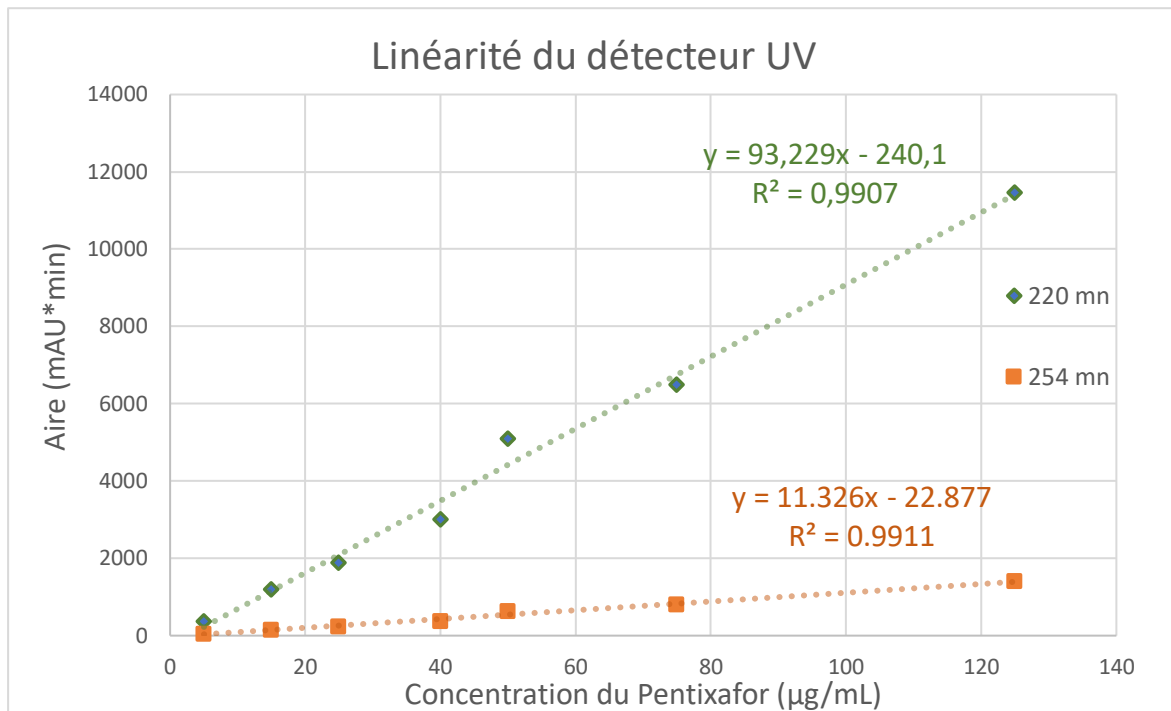


Figure 23 : Représentation graphique de la linéarité du détecteur UV

- Radiodétecteur : la **Figure 24** montre les coups par minutes (CPM) enregistrés en fonction de l'activité injectée en gallium. Le coefficient de corrélation est de 0,9997. La linéarité du radiodétecteur est conforme.

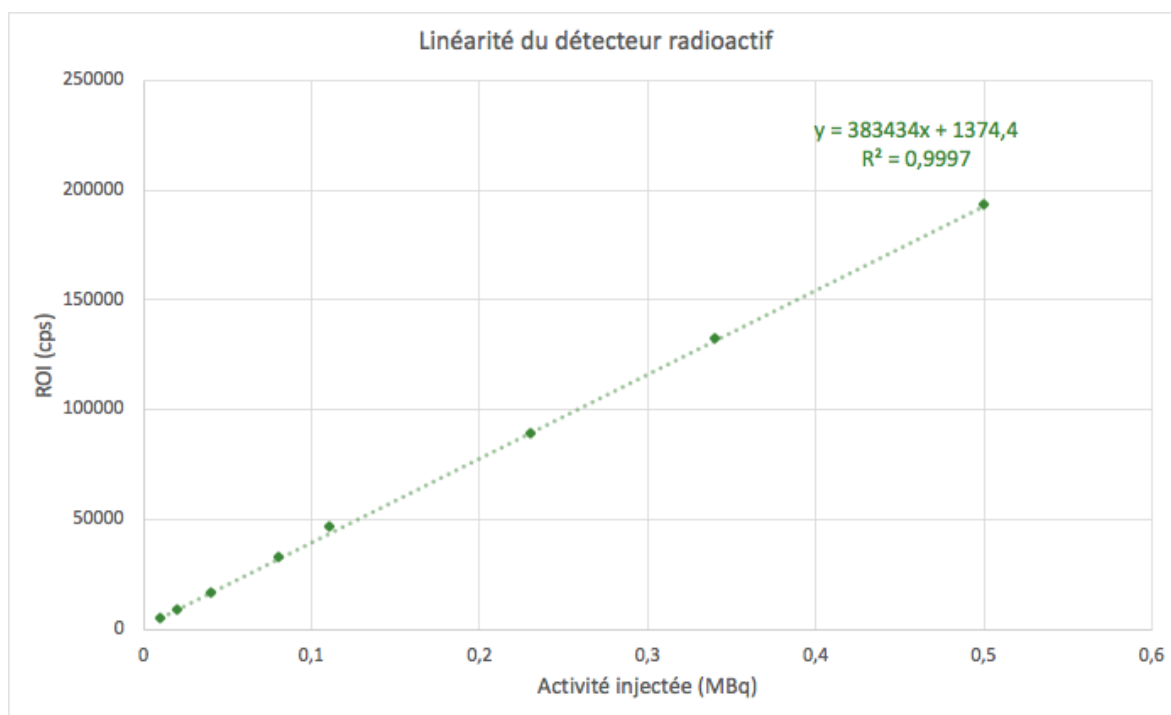


Figure 24 : Représentation graphique de la linéarité du radiodétecteur

d) *Limite de détection*

La limite de détection a été déterminée grâce à la gamme de concentration utilisée pour la linéarité. Au point de gamme correspondant à 5 µg /mL, le détecteur UV détecte bien un pic à 220 nm et à 254 nm qui correspond respectivement à une valeur d'aire sous la courbe de 375 mAu*min et de 52 mAu*min. En calculant la concentration théorique à partir de la droite d'équation, nous obtenons une concentration en pentixafor de 9,17 µg /mL à 220 nm et de 6,59 µg /mL à 254 nm, résultat non satisfaisant. Le calcul pour le point de la gamme de 15 µg /mL étant conforme, ces résultats nous indiquent que la sensibilité de la technique UV n'est pas suffisante pour détecter des concentrations inférieures à 15 µg /mL avec cet appareil.

De plus, nous confirmons ce point grâce aux valeurs obtenues lors des lots de validation. Le coefficient de variation obtenu sur la mesure des concentrations de l'ensemble de valeurs est de 22 %, soit supérieur à 20 %.

IV.3. Contrôles du produit fini

Un tableau récapitulatif de tous les contrôles effectués est situé en **Annexe 4**.

a) *Identification du [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor et détermination de la pureté radiochimique par méthode HPLC*

Les temps de rétention de l'analyse HPLC et la PRC des lots de validation sont présentés dans le **Tableau 17**.

Lot de validation	Lot 1	Lot 2	Lot 3
T_{ref}	8,40 min	8,28 min	8,38 min
<i>Radiodétecteur</i>			
Tr [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor	8,48 min	8,58 min	8,48 min
% d'écart avec la référence	0,95 %	3,6 %	1,2 %
PRC [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor	100 %	100 %	99,95 %
PRC impuretés	0 %	0 %	0,05 %
<i>Détecteur UV (220 nm)</i>			
Tr [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor	8,47 min	8,48 min	8,39 min
% d'écart avec la référence	0,83 %	2,42 %	0,12 %

Tableau 17 : Résultats des lots de validation par la méthode HPLC

Les Tr obtenus avec le radiodétecteur et le détecteur UV sont conformes aux spécifications de +/- 10 % du T_{ref} . Les graphiques de l'analyse obtenus pour le lot 1 sont présentés dans l'**Annexe 5**. Les impuretés radioactives visibles en HPLC sont les ions Ga^{3+} libres et seraient visualisés au début du radiochromatogramme. Les impuretés de gallium hydrolysé ne sont pas visibles en HPLC car le $Ga(OH)_3$ est insoluble et est retenu sur le fritté de la colonne C18. Pour nos lots de validation, on ne retrouve pas d'impuretés radiochimiques et la PRC est > 95 %.

b) Détermination de la pureté radiochimique par méthode CCM

Les résultats des taux de recouvrement des pics obtenus par CCM des lots de validation sont présentés dans le **Tableau 18**.

Lot de validation	Lot 1	Lot 2	Lot 3
<i>Mélange ammonium / méthanol</i>			
[68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor	99,89 %	99,86 %	99,81 %
Gallium hydrolysé	0,11 %	0,14 %	0,19 %
<i>Solvant citrate</i>			
Ions Ga³⁺	0 %	0,04 %	0,16 %
[68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor	100 %	99,96 %	99,84 %

Tableau 18 : Résultats de la PRC des lots de validation par CCM

Ces résultats sont conformes aux spécifications de PRC > 95 % et du taux de gallium hydrolysé < 3 %. Un exemple de radiochromatogramme obtenu pour le lot 1 est présenté en **Annexe 6**.

c) Détermination du pH

La mesure du pH de l'ensemble des lots de validation par bandelette pH donne un pH de 5, ce qui est conforme.

d) Détermination des endotoxines

Les résultats du taux d'endotoxines des lots de validation sont présentés dans le **Tableau 19**. La pharmacopée impose pour le Ga-DOTATOC que le taux d'endotoxine soit inférieur à 175 EU / V, V étant la dose maximale recommandée en mL. Le volume final de notre solution de [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor étant de 12 mL, le taux d'endotoxines doit être inférieur à 15 EU / mL. Les résultats obtenus sont conformes.

Lot de validation	Lot 1	Lot 2	Lot 3
Taux d'endotoxines	0,524 EU / mL	0,640 EU / mL	0,600 EU / mL

Tableau 19 : Résultats du taux d'endotoxines pour les lots de validation

e) Identification radionucléidique du [68Ga]

Les résultats de la période physique obtenue pour les lots de validation sont regroupés dans le **Tableau 20** et sont conformes.

Lot de validation	Lot 1	Lot 2	Lot 3
Période physique	67,8 min	67,7 min	67,4 min

Tableau 20 : Résultats de l'identification radionucléidique du [68Ga]

f) Détermination de la pureté radionucléidique

Après les 48h de décroissance, le taux de [68Ge]-Germanium présent dans la solution est de 0 % pour les lots de validation 1 et 2 et de 3.10^{-7} % pour le lot de validation 3.

g) Stérilité

Les résultats des échantillons envoyés sont tous revenus stériles.

h) Détermination de la concentration en éthanol

La concentration en éthanol des 3 lots de validation est respectivement de 9,1% ; 9,3 % ; 8,8 % pour les lots 1, 2 et 3 ; soit inférieure à 10 %. Le test est conforme.

IV.4. Étude de stabilité

L'ensemble des résultats de l'étude de stabilité des trois lots de validation aux T0, T+1h, T+2h sont présentés dans le **Tableau 21**.

	Lot 1			Lot 2			Lot 3		
	T0	T+1h	T+2h	T0	T+1h	T+2h	T0	T+1h	T+2h
Caractères organoleptiques	Conforme								
Tr [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor (min)	8,48	8,55	8,43	8,58	8,53	8,57	8,48	8,53	8,58
Taux de Ga ³⁺ par HPLC (%)	0	0,15	0,13	0	0,16	0,10	0,05	0	0,07
Pureté radiochimique par CCM (%)	99,89	99,82	99,89	99,86	99,98	99,9	99,81	99,82	99,89
pH	5								

Tableau 21 : Résultats de l'étude de stabilité

La PRC de la solution de [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor reste > 95 % jusqu'à 2 heures après la synthèse et le taux d'impuretés (Ga³⁺) est < 2 %. On peut donc dire que la solution de [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor est stable au moins jusqu'à 2h.

V. Discussion

V.1. Choix des conditions de marquage

a) Le pH et le tampon

Le pH du milieu réactionnel est très important lors de la réaction de complexation entre le [68Ga] et le chélateur DOTA. Le pourcentage d'incorporation du [68Ga] dans le chélateur DOTA est influencé par le pH du milieu réactionnel comme le montre la **Figure 25**. On peut voir qu'il n'y a aucune incorporation du [68Ga] dans la cage DOTA à pH 1 et que la vitesse initiale d'incorporation augmente avec le pH. Par contre, on observe également qu'au-delà de pH 4, le taux d'incorporation après 2 min est plus lent et que la complexation totale du gallium n'est atteinte qu'au bout de 15 min. C'est la raison principale pour laquelle l'ensemble des techniques de radiomarquage de peptides modifiés par le DOTA avec le gallium est réalisé sur des séquences de 10 à 15 min à pH proche de 4 sans dépasser 4,5.

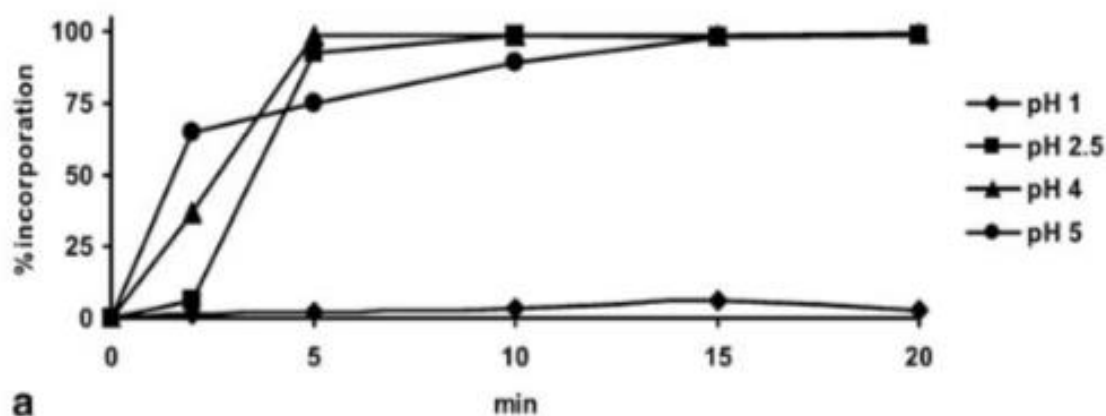


Figure 25 : Influence du pH sur la réaction de marquage du [68Ga]-DOTA (92)

D'autres synthèses ont été réalisées et les valeurs de pH du milieu réactionnel se situent entre 3,5 et 3,8 (93,94). Les rendements de complexation du [68Ga] avec le DOTA sont meilleurs pour des valeurs de pH entre 3,5 et 4 (94). Comme nous l'avons dit plus haut, à des valeurs de pH plus basique ($\text{pH} > 4$), le [68Ga] forme des hydroxydes qui ne se complexent pas au DOTA. A noter que le complexe [68Ga]-DOTA a une coordination de 6 ; le [68Ga] se couple au DOTA par 4 liaisons amine et 2 liaisons carboxylate (**Figure 26**). Or, pour des

valeurs de pH trop acide ($\text{pH} < 2-3$), toutes les fonctions amine du DOTA sont protonées en ammonium (NH_4^+) et l'incorporation du $[^{68}\text{Ga}]$ n'est plus possible. En pratique, deux types de solution tamponnée sont utilisés : le formiate et l'acétate dont les pKa sont proches des valeurs mentionnées ci-dessus. D'autres solutions tampons pourraient théoriquement être d'intérêt comme le tampon citrate, toutefois ce dernier est à proscrire car il forme avec le gallium des précipités ou des complexes trop stables pour réaliser des échanges métalliques vers le DOTA dans des conditions compatibles avec une stabilité du vecteur.



Figure 26 : Représentation du complexe $[^{68}\text{Ga}]$ -DOTA

Nous n'avons pas mesuré la valeur du pH dans le milieu réactionnel au moment du marquage pour des raisons de radioprotection. En revanche, nous avons mesuré le pH de la solution tampon présente dans le réacteur, le pH était de 4,53. S'ajoute à cela, les 1 mL d'HCl / NaCl qui permettent de décrocher le $[^{68}\text{Ga}]$ de la colonne SCX. Après calcul, la valeur théorique du pH du milieu réactionnel serait d'environ 4,3. Nous avons montré lors de tests préliminaires que le pH du milieu, dans les conditions expérimentales choisies, est plus acide et s'approche d'une valeur de 4, probablement dû aux ions H^+ fixés sur la colonne lors de l'élution du générateur et qui sont décrochés du support lorsque l'on ajoute le solvant fortement concentré en sodium, par échange de cations Na^+ / H^+ . De façon à mieux maîtriser les variations de pH en lien avec le mode de pré-purification de l'éluat, nous avons sélectionné le tampon acétate 0,5 M pH 4,5. En effet, le chargement de la colonne SCX avec 5 à 10 mL d'HCl 0,1 M lors de l'élution du générateur induit des échanges de cations Na^+ / H^+ qui entraînent des abaissements du pH du milieu réactionnel jusqu'à 1 unité avec des solutions 0,5 M. Dans ces conditions, l'utilisation d'acétate plutôt que le formiate apparaît donc plus judicieux compte tenu des pKa respectifs ces deux types de tampons (pKa acétate : 4,7 ; pKa formiate : 3,7).

Dans la pratique professionnelle, l'ajustement de ces conditions de marquage peut être fluctuant. Pour mesurer le pH des solutions, les services de radiopharmacie ne sont pas toujours équipés d'un pH mètre. Le recours à l'utilisation de bandelettes indicatrices de pH est plus répandu, cette méthode plus simple d'utilisation est cependant nettement moins précise. La réalisation de tests de répétabilité lors de la mise au point de la technique s'avère également d'un grand intérêt et nécessaire en respectant un protocole de radiomarquage bien précis. La mise à disposition de kits de radiomarquage est également un avantage pour garantir une bonne reproductibilité de synthèse. Dans notre cas, nous avons utilisé les kits de radiomarquage fourni par le laboratoire Pentixapharm.

b) La température

Le milieu réactionnel est chauffé pour accélérer la complexation du [68Ga] avec le chélateur DOTA. La **Figure 27** montre que l'incorporation du [68Ga] est plus rapide pour des valeurs de températures de 80°C. Compte tenu de la période du [68Ga], il est intéressant d'obtenir le produit fini et ses contrôles associés en un temps ne dépassant pas 1,5 période afin d'avoir suffisamment d'activité pour injecter le patient dans de bonnes conditions. C'est la raison pour laquelle, chaque fois que le vecteur le permet, la réaction de radiomarquage est réalisée à haute température sur des temps les plus courts possibles, ceci même lorsque le vecteur est fonctionnalisé avec des ligands capables de complexer le [68Ga] à température ambiante (NOTA, HBED). En pratique, les conditions expérimentales sélectionnées dans ce travail répondent à ce critère. Le vecteur n'est pas altéré par l'étape de chauffage et le temps de 10 min est suffisant pour obtenir de bons rendements de radiomarquage de façon reproductible. Un chauffage au-delà de 100°C n'est pas souhaitable avec le matériel utilisé (synthèse automatisée avec des cassettes de fabrication stériles) qui comporte notamment des composants sensibles aux hautes températures (tubulures et robinets trois-voies notamment). En effet, l'étape de purification implique un transfert des solutions chauffées depuis le réacteur jusqu'à la colonne SEP-PACK, et ce transfert risque d'altérer les composants plastifiés de la cassette si les solutions sont au-delà de 80 °C. Lors de la mise au point de la synthèse automatisée, des tests ont été réalisés en chauffant à 140°C mais les rendements de synthèse obtenus ont été inférieurs à ceux obtenus à 95°C.

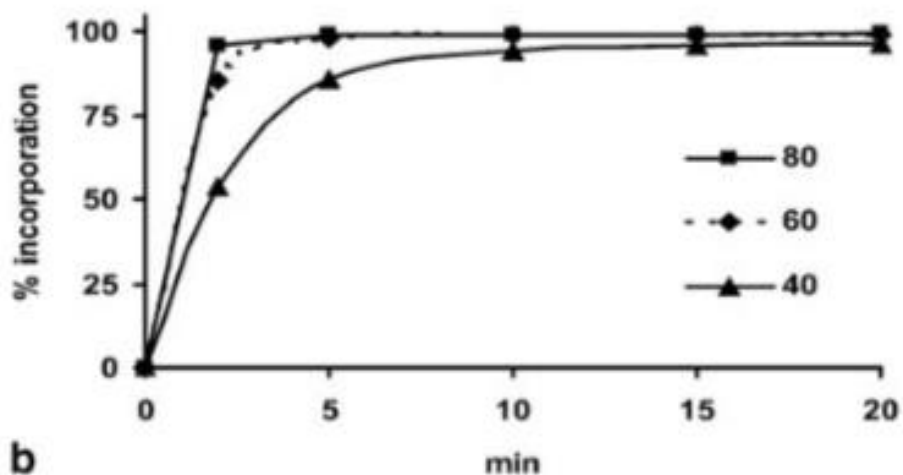


Figure 27 : Influence de la température sur le radiomarquage du Ga-DOTATOC à pH 3,5-4 (92)

Dans la pratique courante, pour garantir une bonne température de radiomarquage, l'utilisation de réacteurs à « effet peltier » permet d'atteindre la température souhaitée et de refroidir la solution si besoin sans ajout de fluide.

c) La pré-purification

La méthode de pré-purification employée est celle de *Mueller et al* (70) qui utilise une colonne échangeuse de cations car cette colonne est déjà pré-montée sur nos cassettes à usage unique. Les générateurs de gallium, même ceux à matrice non métallique, relarguent des métaux contaminants lors de l'élution du gallium, ce qui diminue l'activité spécifique (AS) de l'éluat. Avec le générateur utilisé, les principaux métaux relargués sont le Fer, le Zinc et le Titane qui peuvent entrer en compétition avec le gallium lors de la complexation avec le DOTA, surtout le Fer car ce métal a aussi un état d'oxydation +III et un rayon ionique très proche de celui du gallium (65 ppm vs 62 ppm) (54). Une autre source de relargage de métaux capables de diminuer les AS des radiopharmaceutiques galliés concerne le réacteur lui-même, notamment lorsque celui-ci est en verre. Outre la présence d'ions métalliques non radioactifs dans les éluats, les générateurs relarguent tous des traces de germanium qui diminuent la pureté radionucléidique des éluats.

Mais d'autres méthodes de pré-purification existent et sont présentées dans le **Tableau 22** (70).

Méthode	Solvant d'éluion	Colonne	Eluent	Avantages	Inconvénient
Éluion fractionnée (92)	HCl 0,1 M	-	-	Eluat prêt à l'emploi ; 80% de l'activité dans un petit volume (1-2mL)	Diminution de l'AS Faible rendement de synthèse Pas d'élimination des métaux non radioactifs
Colonne anionique (94)	HCl 0,1 M puis ajout HCl 5,5M	SAX	H ₂ O	Pas de solvant organique	Processus long Possible formation de complexe anionique avec d'autres métaux
Colonne cationique (93,95)	HCl 0,1 M	Colonne cationique	Acétone / HCl	Méthode bien établie	Utilise un solvant organique : contrôle par CPG du taux d'acétone sur le produit fini
	HCl 0,1 M	SCX	NaCl / HCl	Pas de solvant organique AS élevée	-
Colonne cationique puis anionique	HCl 0,1 M	SCX puis SAX	HCl 5,5 M puis H ₂ O	Pas de solvant organique	Nécessite 2 colonnes chromatographiques

Tableau 22 : Méthodes de pré-purification de l'éluat de [68Ga]

A noter que lors du processus de synthèse du Somakit®, il n'y a pas d'étape de pré-purification. La trousse du Somakit® contient un agent chélatant, la phélantroline, qui complexe les métaux contaminants pour garantir un bon rendement de marquage, mais ces complexes sont tout de même injectés au patient.

V.2. La validation de la méthode HPLC

La validation de la méthode analytique HPLC suit les recommandations de l'ICH "Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology" (89).

Concernant la solution de référence utilisée pour le détecteur UV, nous avons fait le choix d'utiliser un aliquot issu de la reconstitution de la solution mère de DOTA-Pentixafor. En effet, la forme complexée du pentixafor n'étant pas commercialisée et il n'existe pas de référence commerciale pour le pentixafor lui-même. En pratique, nous avons analysé la solution de Ga-DOTA-Pentixafor froide obtenue de façon manuelle par mélange à pH 5-6 d'un équivalent de chlorure de Gallium avec un équivalent de DOTA-Pentixafor. Avec la colonne choisie et le gradient utilisé, les temps de rétention de la solution de référence (DOTA-Pentixafor) et du complexe Ga-DOTA-Pentixafor diffèrent très peu (moins de 0.5 min). Il nous a paru préférable de garder comme référence le produit le plus pur possible et donc le DOTA-Pentixafor. En pratique, il apparaît que le temps de rétention du Ga-DOTA-Pentixafor sur le radiochromatogramme et celui de la référence sur le profil UV sont décalés, mais cela n'est dû qu'au fait du montage en série des deux types de détecteurs.

Au sujet de la limite de détection, celle-ci a été estimée à 15 µg /mL. En revanche, la concentration théorique de peptide (Pentixafor) dans le produit fini est théoriquement inférieure à 5 µg /mL (si l'on ne tient pas compte des pertes lors du radiomarquage, cette concentration devrait être égale à 4,16 µg/mL). Cette concentration est inférieure à la limite de détection, donc le détecteur UV ne nous permet pas de quantifier la concentration de notre produit fini. Une solution pour y remédier serait d'utiliser la méthode des ajouts dosés. C'est-à-dire ajouter une concentration connue de peptide (Pentixafor froid) à la solution de produit fini de façon à obtenir une concentration en peptide supérieure à 15 µg /mL.

V.3. Les contrôles du produit fini

Les méthodes de contrôle qualité du [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor sont calquées sur celles décrites dans la Pharmacopée pour le Ga-Edotreotide (Somakit®), seul radiopharmaceutique gallié ayant une AMM et dont les méthodes de contrôle sont validées et disponibles dans la pharmacopée européenne.

a) HPLC

Les conditions de contrôle de l'HPLC ont été choisies selon les mêmes conditions de contrôle que le Ga-Edotreotide qui est décrit ci-joint dans la pharmacopée (**Figure 28**) :

Phase mobile :

- *phase mobile A : acide trifluoroacétique R, eau pour chromatographie R (0,1:99,9 V/V),*
- *phase mobile B : acide trifluoroacétique R, acétonitrile pour chromatographie R (0,1:99,9 V/V),*

Intervalle (min)	Phase mobile A (pour cent V/V)	Phase mobile B (pour cent V/V)
0 - 8	76	24
8 - 9	76 → 40	24 → 60
9 - 14	40	60

Débit : 0,6 mL/min.

Détection : spectrophotomètre à 220 nm et détecteur de radioactivité montés en série.

Injection : 20 µL.

Figure 28 : Conditions de contrôle HPLC du Ga-Edotreotide issues de la pharmacopée (96)

Nous utilisons le même gradient de solvant que le Ga-Edotreotide en raison leur lipophilie qui est similaire : $\text{Log } P = -2,90 \pm 0,08$ pour le [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor (97) et $\text{Log } P = -2,90 \pm 0,4$ pour le Ga-Edotreotide (98). La phase stationnaire de la colonne est lipophile (apolaire). Au début de l'analyse, le gradient de solvant démarre avec une plus forte proportion d'eau que d'acétonitrile, la phase mobile est donc plus hydrophile (polaire). Le [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor est retenu sur la colonne lorsque celle-ci est conditionnée avec un solvant aqueux (polaire). Les ions Ga^{3+} hydrophiles quant à eux sont élués directement car ils ne sont pas retenus par la colonne, et leur pic apparaît donc très tôt sur le graphe. Toutefois, comme cela a été mentionné dans les propriétés chimiques du gallium, en

présence d'eau, le gallium Ga^{3+} forme des complexes ($\text{Ga}(\text{OH})_3$) qui précipitent. C'est pourquoi, il est important que les phases mobiles soient acidifiées à un pH inférieur à 3 pour limiter la formation des complexes $\text{Ga}(\text{OH})_3$. Toutefois, lorsque les complexes $\text{Ga}(\text{OH})_3$ se sont formés durant le procédé de radiomarquage, leur présence ne sera pas forcément détectée lors de l'analyse HPLC, car ils seront retenus en tête de colonne par les frittés qui la protège. Il apparaît donc nécessaire de compléter les analyses de pureté par une autre technique qui sera décrite ci-dessous dans la partie CCM. Au cours de l'analyse, la variation de solvant vers une augmentation des proportions d'ACN modifie la phase mobile qui devient plus lipophile (apolaire) et entraîne la désorption du $[68\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-Pentixafor de la colonne, visualisé par le deuxième pic sur le graphe. La méthode HPLC nous permet d'identifier les pics de $[68\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-Pentixafor et de Ga^{3+} libre et de déterminer leur pourcentage correspondant.

b) CCM

De façon à quantifier la PRC du $[68\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-Pentixafor, du Ga^{3+} libre et des colloïdes de gallium, nous complétons nos contrôles qualité avec une CCM. Pour cela, nous employons les méthodes de contrôle décrits dans le RCP du Somakit®. Le RCP indique l'utilisation d'une CCM sur bandelette ITLC-SG avec comme solvant de migration un mélange d'acétate d'ammonium / méthanol (50/50). Ce contrôle permet de détecter les ions Ga^{3+} et les colloïdes qui ont un rapport frontal de 0 à 0,1 alors que le produit radiomarqué et ses impuretés associées vont migrer. Les résultats obtenus avec les deux techniques HPLC et CCM qui sont complémentaires permettent de déterminer la qualité radiochimique du produit fini.

c) Les contrôles pour la routine clinique

Au final, les contrôles qui seront mis en place pour valider et libérer la synthèse du $[68\text{Ga}]\text{Ga}$ -DOTA-Pentixafor dans le cadre l'essai clinique et qui apparaissent dans le DME sont en libératoire l'examen visuel de la solution pour les caractères organoleptiques et l'absence de particules en suspension ; la détermination de la PRC par HPLC (détecteur UV à 220 nm et radiodétecteur), la détermination de la PRC par CCM, la mesure du pH, le taux d'endotoxines bactériennes puis la détermination de la pureté radionucléidique en post libératoire. La méthode ayant été validée lors des lots de validation pour la mesure de la concentration en éthanol et n'étant pas applicable sur site, ce contrôle ne sera pas fait en

routine. Concernant la stérilité de la solution, la méthode ayant été validée lors des lots de validation et la synthèse étant réalisée dans une enceinte de classe A avec des contrôles microbiologiques de surface, la réalisation de ce test est spécifiée seulement pour les lots de validation dans le DME.

VI. Conclusion

L'objectif de ce travail était le développement et la mise au point de ce nouveau MRP : le [68Ga]-DOTA-Pentixafor, afin de proposer un DME à l'ANSM pour permettre son utilisation dans le cadre d'un essai clinique.

Pour cela, une phase d'essai de radiomarquage a eu lieu en amont entre un peptide : le Pentixafor et un radionucléide : le [68Ga]-Gallium. Une fois la procédure de radiomarquage automatisée mise au point, nous avons réalisé trois radiomarquages en condition clinique que l'on nomme lots de validation. Les résultats obtenus pour ces 3 lots de validation sont utilisés et intégrés au DME en vue de sa soumission. Les résultats des 3 lots de validation ont été conformes aux spécifications établies. En parallèle de ces radiomarquages, la méthode de contrôle HPLC permettant une étape de libération du produit fini a été mise au point. L'appareil et la technique utilisée se sont révélés conformes et valides pour permettre le contrôle du [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor.

Le DME a été rédigé en parallèle de ces radiomarquages par l'équipe de la radiopharmacie et le laboratoire Pentixapharm. Chaque intervenant a complété la partie du DME le concernant. Celle de la radiopharmacie est finalisée et en attente d'envoi à l'ANSM avec le reste de DME.

A l'issue de la validation par les autorités compétentes de ce radiomarquage, le [68Ga]-DOTA-Pentixafor va être utilisé dans un essai clinique pour la détection des lésions cancéreuses chez les patients atteints de myélome multiple. Puis à l'avenir, dans une approche théranostique, le Pentixather, peptide « cousin » du Pentixafor, sera couplé à un radioélément β^- , le [177Lu]-Lutéций en vue de son utilisation en thérapie. La mise au point de ce radiomarquage est en cours d'élaboration au CHU de Nantes.

Ce travail de mémoire a permis d'acquérir des connaissances essentielles pour une activité future en radiopharmacie qui nécessite des compétences non seulement en radiochimie, en chimie analytique, dans le domaine de l'automatisation mais aussi dans le développement d'un nouveau radiopharmaceutique. Dans un futur proche, ces connaissances seront mises à profit pour le développement d'un laboratoire de radiopharmacie.

Bibliographie

1. Beyer T, Townsend DW, Brun T, Kinahan PE, Charron M, Roddy R, et al. A Combined PET/CT Scanner for Clinical Oncology. *J Nucl Med.* Janv 2000;41(8):1369-79.
2. Vaquero JJ, Kinahan P. Positron Emission Tomography: Current Challenges and Opportunities for Technological Advances in Clinical and Preclinical Imaging Systems. *Annu Rev Biomed Eng.* 2015;17:385-414.
3. Verel I, Visser GWM, Dongen GA van. The Promise of Immuno-PET in Radioimmunotherapy. *J Nucl Med.* Janv 2005;46(1 suppl):164S-171S.
4. Vallabhajosula S, Solnes L, Vallabhajosula B. A Broad Overview of Positron Emission Tomography Radiopharmaceuticals and Clinical Applications: What Is New? *Seminars in Nuclear Medicine.* Juill 2011;41(4):246-64.
5. Grignon C, Barbet J, Bardiès M, Carlier T, Chatal JF, Couturier O, et al. Nuclear medical imaging using $\beta+\gamma$ coincidences from ^{44}Sc radio-nuclide with liquid xenon as detection medium. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment.* Févr 2007;571(1-2):142-5.
5. Muehllehner G, Karp JS. Positron emission tomography. *Phys Med Biol.* Juin 2006;51(13):R117–R137.
7. Velikyan I. Prospective of ^{68}Ga -Radiopharmaceutical Development. *Theranostics.* 2014;4(1):47.
8. Gambhir SS, Czernin J, Schwimmer J, Silverman DHS, Coleman RE, Phelps ME. A Tabulated Summary of the FDG PET Literature. *J Nucl Med.* Janv 2001;42(5 suppl):1S-93S.
9. Salaün P-Y, Abgral R, Malard O, Querellou-Lefranc S, Quere G, Wartski M, et al. Actualisation des recommandations de bonne pratique clinique pour l'utilisation de la TEP en cancérologie. *Bulletin du Cancer.* Mars 2019;106(3):262-74.
10. Endo K, Oriuchi N, Higuchi T, Iida Y, Hanaoka H, Miyakubo M, et al. PET and PET/CT using ^{18}F -FDG in the diagnosis and management of cancer patients. *International Journal of Clinical Oncology.* Sept 2006;11(4):286-96.

11. Tagliabue L, Del Sole A. Appropriate use of positron emission tomography with [18F]fluorodeoxyglucose for staging of oncology patients. *European Journal of Internal Medicine*. Janv 2014;25(1):6-11.
12. Gould MK, Maclean CC, Kushner WG, Rydzak CE, Owens DK. Accuracy of positron emission tomography for diagnosis of pulmonary nodules and mass lesions: a meta-analysis. *JAMA*. Févr 2001;285(7):914-24.
13. Jamet B, Bailly C, Carlier T, Touzeau C, Nanni C, Zamagni E, et al. Interest of Pet Imaging in Multiple Myeloma. *Front Med (Lausanne)*. Avr 2019;6.
14. Cooper KL, Harnan S, Meng Y, Ward SE, Fitzgerald P, Papaioannou D, et al. Positron emission tomography (PET) for assessment of axillary lymph node status in early breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. Mars 2011;37(3):187-98.
15. Bockisch A, Freudenberg LS, Schmidt D, Kuwert T. Hybrid Imaging by SPECT/CT and PET/CT: Proven Outcomes in Cancer Imaging. *Seminars in Nuclear Medicine*. Juill 2009;39(4):276-89.
16. Rice SL, Roney CA, Daumar P, Lewis JS. The Next Generation of Positron Emission Tomography Radiopharmaceuticals in Oncology. *Seminars in Nuclear Medicine*. Juill 2011;41(4):265-82.
17. Rahman WT, Wale DJ, Viglianti BL, Townsend DM, Manganaro MS, Gross MD, et al. The impact of infection and inflammation in oncologic 18F-FDG PET/CT imaging. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Sept 2019;117:109168.
18. Jadvar H. Is There Use for FDG-PET in Prostate Cancer? *Seminars in Nuclear Medicine*. Nov 2016;46(6):502-6.
19. Caroli P, Nanni C, Rubello D, Alavi A, Fanti S. Non-FDG PET in the practice of oncology. *Indian Journal of Cancer*. Janv 2010;47(2):120.
20. Montravers F, Kerrou K, Nataf V, Huchet V, Lotz J-P, Ruszniewski P, et al. Impact of Fluorodihydroxyphenylalanine-(18F) Positron Emission Tomography on Management of Adult Patients with Documented or Occult Digestive Endocrine Tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Avr 2009;94(4):1295-301.
21. Becherer A, Karanikas G, Szabó M, Zettinig G, Asenbaum S, Marosi C, et al. Brain tumour imaging with PET: a comparison between [18 F]fluorodopa and [11 C]methionine. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 1 nov 2003 ;30(11):1561-7.

22. Talbot J-N, Gutman F, Huchet V, Kerrou K, Balogova S, Kerrouche N, et al. Utilité clinique de la tomographie par émission de positons dans le cancer de la prostate. *La Presse Médicale*. Déc 2007;36(12):1794-806.
23. McCarthy M, Siew T, Campbell A, Lenzo N, Spry N, Vivian J, et al. 18F-Fluoromethylcholine (FCH) PET imaging in patients with castration-resistant prostate cancer: prospective comparison with standard imaging. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. Janv 2011;38(1):14-22.
24. Talbot J-N, Gutman F, Fartoux L, Grange J-D, Ganne N, Kerrou K, et al. PET/CT in patients with hepatocellular carcinoma using [18F]fluorocholine: preliminary comparison with [18F]FDG PET/CT. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. Oct 2006;33(11):1285-9.
25. Michaud L, Touijer KA. Mise au point sur l'imagerie moléculaire dans le cancer de la prostate. *Prog Urol*. 2016;26(11-12):619-27.
26. Albert NL, Weller M, Suchorska B, Galldiks N, Soffiatti R, Kim MM, et al. Response Assessment in Neuro-Oncology working group and European Association for Neuro-Oncology recommendations for the clinical use of PET imaging in gliomas. *Neuro Oncol*. Sept 2016;18(9):1199-208.
27. Mankoff DA, Dehdashti F. Imaging Tumor Phenotype: 1 Plus 1 Is More Than 2. *J Nucl Med*. Janv 2009;50(10):1567-9.
28. Johnbeck CB, Knigge U, Kjær A. PET tracers for somatostatin receptor imaging of neuroendocrine tumors: current status and review of the literature. *Future Oncology*. Nov 2014;10(14):2259-77.
29. Afshar-Oromieh A, Avtzi E, Giesel FL, Holland-Letz T, Linhart HG, Eder M, et al. The diagnostic value of PET/CT imaging with the 68Ga-labelled PSMA ligand HBED-CC in the diagnosis of recurrent prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2015;42 :197-209.
30. Afshar-Oromieh A, Zechmann CM, Malcher A, Eder M, Eisenhut M, Linhart HG, et al. Comparison of PET imaging with a 68Ga-labelled PSMA ligand and 18F-choline-based PET/CT for the diagnosis of recurrent prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014 ;41(1) :11-20.
31. Mortimer JE, Bading JR, Colcher DM, Conti PS, Frankel PH, Carroll MI, et al. Functional Imaging of HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Using 64Cu-DOTA-Trastuzumab Positron Emission Tomography. *J Nucl Med*. Janv 2014;55(1):23-9.

32. Dijkers EC, Munnink THO, Kosterink JG, Brouwers AH, Jager PL, Jong JR de, et al. Biodistribution of ⁸⁹Zr-trastuzumab and PET Imaging of HER2-Positive Lesions in Patients With Metastatic Breast Cancer. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2010;87(5):586-92.
33. Gangemi V, Mignogna C, Guzzi G, Lavano A, Bongarzone S, Cascini GL, et al. Impact of [⁶⁴Cu][Cu(ATSM)] PET/CT in the evaluation of hypoxia in a patient with Glioblastoma: a case report. *BMC Cancer*. Déc 2019;19.
34. Yoshii Y, Matsumoto H, Yoshimoto M, Zhang M-R, Oe Y, Kurihara H, et al. Multiple Administrations of ⁶⁴Cu-ATSM as a Novel Therapeutic Option for Glioblastoma: a Translational Study Using Mice with Xenografts. *Transl Oncol*. Nov 2017;11(1):24-30.
35. Li X, Heber D, Leike T, Beitzke D, Lu X, Zhang X, et al. [⁶⁸Ga]Pentixafor-PET/MRI for the detection of Chemokine receptor 4 expression in atherosclerotic plaques. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2018;45(4):558-66.
36. Schottelius M, Osl T, Poschenrieder A, Hoffmann F, Beykan S, Hänscheid H, et al. [¹⁷⁷Lu]pentixather: Comprehensive Preclinical Characterization of a First CXCR4-directed Endoradiotherapeutic Agent. *Theranostics*. Juin 2017;7(9):2350-62.
37. Strauss LG, Koczan D, Seiz M, Tuettenberg J, Schmieder K, Pan L, et al. Correlation of the Ga-68-Bombesin Analog Ga-68-BZH3 with Receptors Expression in Gliomas as Measured by Quantitative Dynamic Positron Emission Tomography (dPET) and Gene Arrays. *Mol Imaging Biol*. Juin 2012;14(3):376-83.
38. Abiraj K, Mansi R, Tamma M-L, Fani M, Forrer F, Nicolas G, et al. Bombesin antagonist-based radioligands for translational nuclear imaging of gastrin-releasing peptide receptor-positive tumors. *J Nucl Med*. Déc 2011;52(12):1970-8.
39. Domanska UM, Kruizinga RC, Nagengast WB, Timmer-Bosscha H, Huls G, Vries EGE de, et al. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: No place to hide. *European Journal of Cancer*. Janv 2013;49(1):219-30.
40. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 Entry Cofactor: Functional cDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor. *J Immunol*. Juin 2011;186(11):6076-81.
41. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. Mars 2001;410(6824):50-6.

42. Demmer O, Gourni E, Schumacher U, Kessler H, Wester H-J. PET Imaging of CXCR4 Receptors in Cancer by a New Optimized Ligand. *ChemMedChem*. Oct 2011;6(10):1789-91.
43. Gourni E, Demmer O, Schottelius M, D'Alessandria C, Schulz S, Dijkgraaf I, et al. PET of CXCR4 Expression by a ⁶⁸Ga-Labeled Highly Specific Targeted Contrast Agent. *J Nucl Med*. Nov 2011;52(11):1803-10.
44. Debnath B, Xu S, Grande F, Garofalo A, Neamati N. Small Molecule Inhibitors of CXCR4. *Theranostics*. 2013;3(1):47-75.
45. Weiss IdoD, Jacobson O. Molecular Imaging of Chemokine Receptor CXCR4. *Theranostics*. Janv 2013;3(1):76-84.
46. Lapa C, Lückerath K, Rudelius M, Schmid J-S, Schoene A, Schirbel A, et al. [⁶⁸Ga]Pentixafor-PET/CT for imaging of chemokine receptor 4 expression in small cell lung cancer - initial experience. *Oncotarget*. Janv 2016;7(8):9288-95.
47. Philipp-Abbrederis K, Herrmann K, Knop S, Schottelius M, Eiber M, Lückerath K, et al. In vivo molecular imaging of chemokine receptor CXCR4 expression in patients with advanced multiple myeloma. *EMBO Molecular Medicine*. Avr 2015; 7(4):477-87.
48. Lapa C, Schreder M, Schirbel A, Samnick S, Kortüm KM, Herrmann K, et al. [⁶⁸Ga]Pentixafor-PET/CT for imaging of chemokine receptor CXCR4 expression in multiple myeloma - Comparison to [¹⁸F]FDG and laboratory values. *Theranostics*. Janv 2017 ;7(1):205-12.
49. Lapa C, Lückerath K, Kleinlein I, Monoranu CM, Linsenmann T, Kessler AF, et al. ⁶⁸Ga-Pentixafor-PET/CT for Imaging of Chemokine Receptor 4 Expression in Glioblastoma. *Theranostics*. Janv 2016;6(3):428-34.
50. Thackeray JT, Derlin T, Haghikia A, Napp LC, Wang Y, Ross TL, et al. Molecular Imaging of the Chemokine Receptor CXCR4 After Acute Myocardial Infarction. *JACC: Cardiovascular Imaging*. Déc 2015;8(12):1417-26.
51. Lapa C, Reiter T, Werner RA, Ertl G, Wester H-J, Buck AK, et al. [⁶⁸Ga]Pentixafor-PET/CT for Imaging of Chemokine Receptor 4 Expression After Myocardial Infarction. *JACC: Cardiovascular Imaging*. Déc 2015;8(12):1466-8.
52. Poschenrieder A, Osl T, Schottelius M, Hoffmann F, Wirtz M, Schwaiger M, et al. First ¹⁸F-Labeled Pentixafor-Based Imaging Agent for PET Imaging of CXCR4 Expression In Vivo. *Tomography*. Juin 2016;2(2):85-93.

53. 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.* Mai 2010;110(5):2858-902.
54. Fani M, André JP, Maecke HR. ⁶⁸Ga-PET: a powerful generator-based alternative to cyclotron-based PET radiopharmaceuticals. *Contrast Media & Molecular Imaging.* 2008 ;3(2):53-63.
55. Bartholomä MD, Louie AS, Valliant JF, Zubieta J. Technetium and Gallium Derived Radiopharmaceuticals: Comparing and Contrasting the Chemistry of Two Important Radiometals for the Molecular Imaging Era. *Chem Rev.* Mai 2010;110(5):2903-20.
56. Kilian K. ⁶⁸Ga-DOTA and analogs: Current status and future perspectives. *Rep Pract Oncol Radiother.* Mai 2014;19(Suppl):S13-21.
57. Velikyan I, Maecke H, Langstrom B. Convenient Preparation of ⁶⁸Ga-Based PET-Radiopharmaceuticals at Room Temperature. *Bioconjugate Chemistry.* Févr 2008 ;19(2):569-73.
58. Boros E, Ferreira CL, Cawthray JF, Price EW, Patrick BO, Wester DW, et al. Acyclic Chelate with Ideal Properties for ⁶⁸Ga PET Imaging Agent Elaboration. *Journal of the American Chemical Society.* Nov 2010;132(44):15726-33.
59. Marganiec-Gałązka J, Nähle OJ, Kossert K. Activity determination of ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga by means of $4\pi\beta(\check{C})-\gamma$ coincidence counting. *Applied Radiation and Isotopes.* Avr 2018;134:240-4.
60. Walker RC, Smith GT, Liu E, Moore B, Clanton J, Stabin M. Measured Human Dosimetry of ⁶⁸Ga-DOTATATE. *J Nucl Med.* Juin 2013;54(6):855-60.
61. Alnahwi AH, Tremblay S, Ait-Mohand S, Beaudoin J-F, Guérin B. Automated radiosynthesis of ⁶⁸Ga for large-scale routine production using ⁶⁸Zn pressed target. *Applied Radiation and Isotopes.* Févr 2020;156:109014.
62. Code de la santé publique - Article L5121-1. Code de la santé publique.
63. Rösch F. Past, present and future of ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generators. *Applied Radiation and Isotopes.* Juin 2013;76:24-30.
64. Gleason GI. A positron cow. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes.* Juill 1960;8(2):90-4.
65. Yano Y, Anger HO. A Gallium⁶⁸ Positron Cow for Medical Use. *J Nucl Med.* Janv 1964;5(6):484-7.

66. Martiniova L, De Palatis L, Etchebehere E, Ravizzini G. Gallium-68 in Medical Imaging. *Current Radiopharmaceuticals*. Déc 2016;9(3):187-207.
67. Résumé des Caractéristiques du Produit GalliaPharm, 0,74 à 1,85 GBq, générateur de radionucléides
68. Ad G. SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS for Galli Ad, 0.74 -1.85 GBq, radionuclide generator :24.
69. Pharm euro 10.0. GALLIUM (⁶⁸Ga) (CHLORURE DE) POUR RADIOMARQUAGE, SOLUTION DE. 2013. pdf.
70. Mueller D, Breeman WAP, Klette I, Gottschaldt M, Odparlik A, Baehre M, et al. Radiolabeling of DOTA-like conjugated peptides with generator-produced ⁶⁸Ga and using NaCl-based cationic elution method. *Nat Protoc*. Juin 2016;11(6):1057-66.
71. Production of long lived parent radionuclides for generators : ⁶⁸Ge, ⁸⁹Sr, ⁹⁰Sr and ¹⁸⁸W. IAEA. Pub1436_web.pdf
72. Breeman WAP, Verbruggen AM. The ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga generator has high potential, but when can we use ⁶⁸Ga-labelled tracers in clinical routine? *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Juill 2007;34(7):978-81.
73. Anonymous. Clinical Trial Regulation. European Medicines Agency. 2018
74. Loi n° 88-1138 du 20 décembre 1988 relative à la protection des personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales.
75. Santé M des S et de la. Recherches impliquant la personne humaine. Ministère des Solidarités et de la Santé. 2020.
76. Code de la santé publique - Article L1121-1. Code de la santé publique.
77. Code de la santé publique - Article R1121-1-1. Code de la santé publique.
78. INSERM. Médicament (développement du). Inserm - La science pour la santé.
79. Arrêté du 2 décembre 2016 fixant le contenu et les modalités de présentation du dossier de demande d'avis au comité de protection des personnes sur un projet de recherche mentionnée au 1° ou au 2° de l'article L. 1121-1 du code de la santé publique ne portant pas sur un produit mentionné à l'article L. 5311-1 du même code.
80. Communication de la Commission — Indications détaillées portant sur la demande présentée aux autorités compétentes en vue d'obtenir l'autorisation de procéder à l'essai clinique d'un médicament à usage humain, sur la notification de modifications substantielles et sur la déclaration de fin de l'essai clinique (CT-1). :19.

81. Avis aux promoteurs - Formulaire - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé.
82. Phase pilote : application du Règlement UE N°536/2014 du Parlement européen - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé.
83. Code de la santé publique - Article R5126-9. Code de la santé publique.
84. Code de la santé publique - Article R1333-104. Code de la santé publique.
85. EUR-Lex - 32001L0020 - EN - EUR-Lex.
86. Code de la santé publique - Article R1333-13. Code de la santé publique.
87. DAUE R. EudraLex - Volume 10 - Clinical trials guidelines. Public Health - European Commission. 2017.
88. Poschenrieder A, Schottelius M, Schwaiger M, Kessler H, Wester H-J. The influence of different metal-chelate conjugates of pentixafor on the CXCR4 affinity. *EJNMMI Res. Avr* 2016;6.
89. Abraham J. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. In: Tietje C, Brouder A, éditeurs. *Handbook of Transnational Economic Governance Regimes*. Brill | Nijhoff; 2010.
90. 2.6.14. Essai des endotoxines ... - *European Pharmacopoeia 10.0*.
91. Gallium (68Ga) (chlorure de) p... - *European Pharmacopoeia 10.0*.
92. Breeman WAP, de Jong M, de Blois E, Bernard BF, Konijnenberg M, Krenning EP. Radiolabelling DOTA-peptides with 68Ga. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. Avr 2005;32(4):478-85.
93. Mueller D, Klette I, Baum RP, Gottschaldt M, Schultz MK, Breeman WAP. Simplified NaCl Based 68 Ga Concentration and Labeling Procedure for Rapid Synthesis of 68 Ga Radiopharmaceuticals in High Radiochemical Purity. *Bioconjugate Chemistry*. Août 2012
94. Meyer G-J, Mücke H, Schuhmacher J, Knapp WH, Hofmann M. 68Ga-labelled DOTA-derivatised peptide ligands. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. Août 2004;31(8).
95. Zhernosekov KP, Filosofov DV, Baum RP, Aschoff P, Bihl H, Razbash AA, et al. Processing of Generator-Produced 68Ga for Medical Application. *J Nucl Med*. Janv 2007;48(10):1741-8.

96. Pharm. Euro. 10.0. GALLIUM (^{68}Ga) ÉDOTRÉOTIDE (SOLUTION INJECTABLE DE). 2013.pdf.
97. Poschenrieder A, Schottelius M, Schwaiger M, Wester H-J. Preclinical evaluation of [^{68}Ga]NOTA-pentixafor for PET imaging of CXCR4 expression in vivo — a comparison to [^{68}Ga]pentixafor. EJNMMI Res. Sept 2016;6.
98. Seemann J, Waldron B, Parker D, Roesch F. DATATOC: a novel conjugate for kit-type ^{68}Ga labelling of TOC at ambient temperature. EJNMMI Radiopharm Chem. Mars 2016;1.

Annexes

Annexe 1 : Tableau des différents antagonistes TEP du CXCR4 en voie de développement

<i>Molécule</i>	<i>Radioélément</i>	<i>Avantages</i>	<i>Inconvénients</i>
<i>AMD 3100 = Plerixafor</i>	[64Cu]	Synthèse courte Forte accumulation dans les tumeurs CXCR4+ Bon ratio tumeur/bruit de fond	Forte accumulation dans le foie
<i>AMD3465</i>	[64Cu]	Synthèse courte Forte accumulation dans les tumeurs CXCR4+	Forte accumulation dans le foie
<i>T 140</i>	[18F]	Fluore 18 disponible	Synthèse longue Rendement radiochimique faible Liaisons aux globules rouges Rétention dans le foie et la rate Faible ratio tumeur/bruit de fond
<i>T 140-2D</i>	[64Cu]	Synthèse courte	Liaison aux globules rouges Transchélation du radiométal dans le foie
<i>T 140-DOTA ou NOTA</i>	[64Cu]	Synthèse courte Diminution de la liaison aux globules rouges	Transchélation du radiométal dans le foie Accumulation non spécifique dans le foie
<i>FC 131</i>	[124I]	Forte accumulation dans les tumeurs CXCR4+	Faible absorption hépatique et intestinale Disponibilité de l'[124I]
<i>FC 131 dimère</i>	[68Ga]	Disponibilité du [68Ga]	Faible accumulation dans les tumeurs Forte accumulation dans le foie
<i>FC 131 monomère = CPCR4-2 = Pentixafor</i>	[68Ga]	Disponibilité du [68Ga] Accumulation spécifique dans les tumeurs CXCR4+	Accumulation significativement plus faible dans le foie

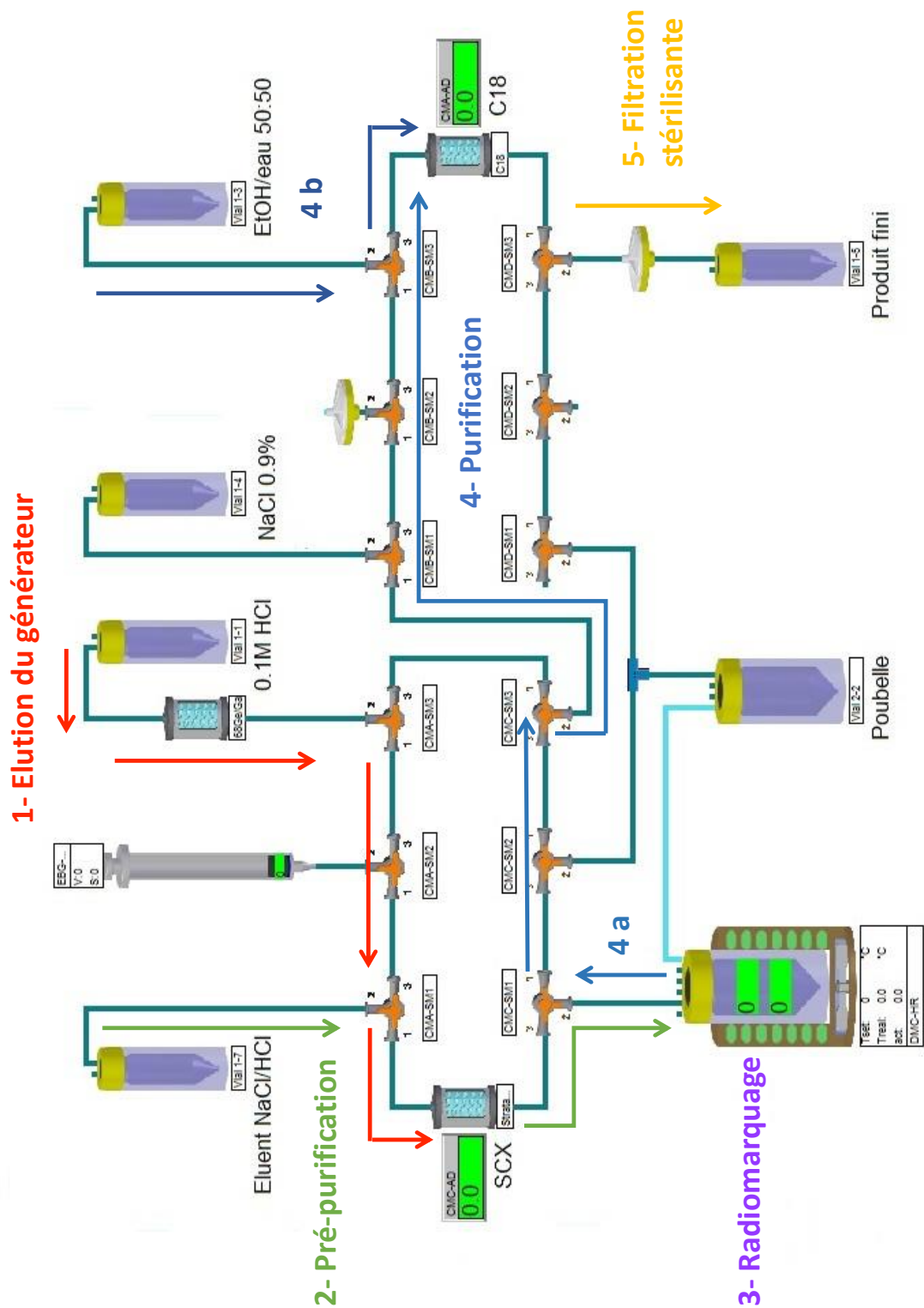
Annexe 2 : Contenu du dossier du médicament expérimental

ANNEXE 7		Contenu du dossier du médicament expérimental (DME) complet	
N°	Intitulé des sections		
Préface	Table des matières et glossaire		
PARTIE 1	DONNEES RELATIVES A LA QUALITE PHARMACEUTIQUE, CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE		
3.2.S	Substance active		
3.2.S.1	Informations générales		
3.2.S.1.1	Nomenclature		
3.2.S.1.2	Structure		
3.2.S.1.3	Propriétés générales		
3.2.S.2	Fabrication		
3.2.S.2.1	Fabricant(s)		
3.2.S.2.2	Description du procédé de fabrication et des contrôles en cours		
3.2.S.2.3	Contrôles des matières		
3.2.S.2.4	Contrôle des étapes critiques et des produits intermédiaires		
3.2.S.2.5	Validation et/ou évaluation de procédé		
3.2.S.2.6	Développement du procédé de fabrication		
3.2.S.3	Caractérisation		
3.2.S.3.1	Elucidation de la structure et d'autres caractéristiques		
3.2.S.3.2	Impuretés		
3.2.S.4	Contrôle de la substance active		
3.2.S.4.1	Spécifications		
3.2.S.4.2	Procédures analytiques		
3.2.S.4.3	Validation de procédures analytiques		
3.2.S.4.4	Analyses de lot(s)		
3.2.S.4.5	Justification des spécifications		
3.2.S.5	Etalons et substances/préparations de référence		
3.2.S.6	Système de fermeture du conditionnement		
3.2.S.7	Stabilité		
3.2.P	Produit fini		
3.2.P.1	Description et composition du produit fini		
3.2.P.2	Développement pharmaceutique		
3.2.P.2.1	Constituants du produit fini		
3.2.P.2.1.1	Substance active		
3.2.P.2.1.2	Excipients		
3.2.P.2.2	Formulation		
3.2.P.2.2.1	Développement de la formulation		
3.2.P.2.2.2	Surdosages		
3.2.P.2.2.3	Propriétés physico-chimiques et biologiques		
3.2.P.2.3	Description du développement du procédé de fabrication		
3.2.P.2.4	Systèmes de fermeture du conditionnement		
3.2.P.2.5	Attributs de la qualité microbiologique		
3.2.P.2.6	Compatibilité		
3.2.P.3	Fabrication		
3.2.P.3.1	Fabricant(s)		
3.2.P.3.2	Composition		
3.2.P.3.3	Description du procédé de fabrication et des contrôles des opérations		
3.2.P.3.4	Contrôles des étapes critiques et des intermédiaires		
3.2.P.3.5	Validation et/ou évaluation de procédé		
3.2.P.4	Contrôle des excipients		
3.2.P.4.1	Spécifications		
3.2.P.4.2	Procédures analytiques		
3.2.P.4.3	Validation des procédures analytiques		
3.2.P.4.4	Justification des spécifications		
3.2.P.4.5	Excipients d'origine animale ou humaine		
3.2.P.4.6	Excipients nouveaux		
3.2.P.5	Contrôle du produit fini		
3.2.P.5.1	Spécifications		
3.2.P.5.2	Procédures analytiques		
3.2.P.5.3	Validation des procédures analytiques		
3.2.P.5.4	Analyses de lots		
3.2.P.5.5	Caractérisation des impuretés		
3.2.P.5.6	Justification des spécifications		
3.2.P.6	Etalons et substances/préparations de référence		
3.2.P.7	Système de fermeture du conditionnement		
3.2.P.8	Stabilité		

N°	Intitulé des sections
3.2.A 3.2.A.1 3.2.A.2 3.2.A.3	Annexes Installations et équipements Evaluation de la sécurité virale (agents conventionnels et non conventionnels) Excipients nouveaux
PARTIE 2	DONNEES NON CLINIQUES
4.2.1. 4.2.1.1 4.2.1.2 4.2.1.3 4.2.1.4 4.2.2 4.2.2.1 4.2.2.2 4.2.2.3 4.2.2.4 4.2.2.5 4.2.2.6 4.2.2.7 4.2.3 4.2.3.1 4.2.3.2 4.2.3.3 4.2.3.4 4.2.3.5 4.2.3.6 4.2.3.7 4.2.4	Pharmacologie Pharmacodynamie primaire Pharmacodynamie secondaire Pharmacologie de sécurité Interactions pharmacodynamiques Pharmacocinétique Méthodes analytiques et rapports de validation Absorption Distribution Métabolisme Excrétion Interactions pharmacocinétiques Autres études pharmacocinétiques Toxicité Toxicité par administration unique Toxicité par administration répétée ^[1] Génotoxicité Carcinogénicité, y compris des évaluations toxicocinétiques d'appui Toxicité de la reproduction et du développement ^[1] Tolérance locale Autres études de toxicité si disponibles Analyse critique des données non cliniques disponibles
PARTIE 3	DONNEES CLINIQUES
5.3.1 5.3.1.1 5.3.1.2 5.3.1.3 5.3.1.4 5.3.2 5.3.2.1 5.3.2.2 5.3.2.3 5.3.3 5.3.3.1 5.3.3.2 5.3.3.3 5.3.3.4 5.3.3.5 5.3.4 5.3.4.1 5.3.4.2 5.3.5 5.3.5.1 5.3.5.2 5.3.5.3 5.3.5.4 5.3.6 5.4.1	Rapport d'études biopharmaceutiques Rapport d'études de biodisponibilité Rapports d'études de biodisponibilité comparative et de bioéquivalence Rapports d'études de corrélation <i>in vitro-in vivo</i> Rapports de méthodes bioanalytiques et analytiques Rapports d'études pharmacocinétiques pertinentes utilisant des biomatériaux humains Rapports d'études sur la fixation aux protéines plasmatiques Rapports d'études de métabolisme hépatique et d'interactions Rapports d'études utilisant d'autres biomatériaux humains Rapports d'études pharmacocinétiques Rapports d'études pharmacocinétiques et de tolérance initiale chez des sujets sains Rapports d'études pharmacocinétiques et de tolérance chez des patients Rapports d'études pharmacocinétiques de facteurs intrinsèques Rapports d'études pharmacocinétiques de facteurs extrinsèques Rapports d'études pharmacocinétiques de population Rapports d'études de pharmacodynamie Rapports d'études de pharmacodynamie et de pharmacocinétique/pharmacodynamie chez des sujets sains Rapports d'études de pharmacodynamie et de pharmacocinétique/pharmacodynamie chez des patients Rapports d'études d'efficacité et de sécurité Rapports d'études cliniques comparatives pertinentes pour l'indication revendiquée Rapports d'études cliniques non comparatives Rapports d'analyses de données issues de plus d'une étude, y compris des analyses intégrées formelles, des méta-analyses et des analyses relais Autres rapports d'études Rapports sur l'expérience après mise sur le marché Références dans la littérature scientifique
ANALYSE CRITIQUE	
Analyse critique, au regard de l'évaluation : - des bénéfices et des risques de la recherche, - des données non cliniques, - et, le cas échéant, cliniques relatives au médicament expérimental	

[1] Les données fournies dans ces rubriques doivent être étayées par des évaluations toxicocinétiques.

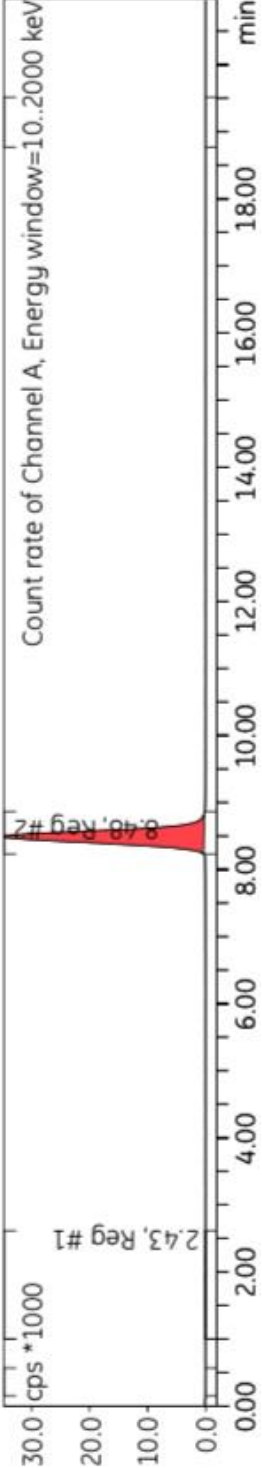
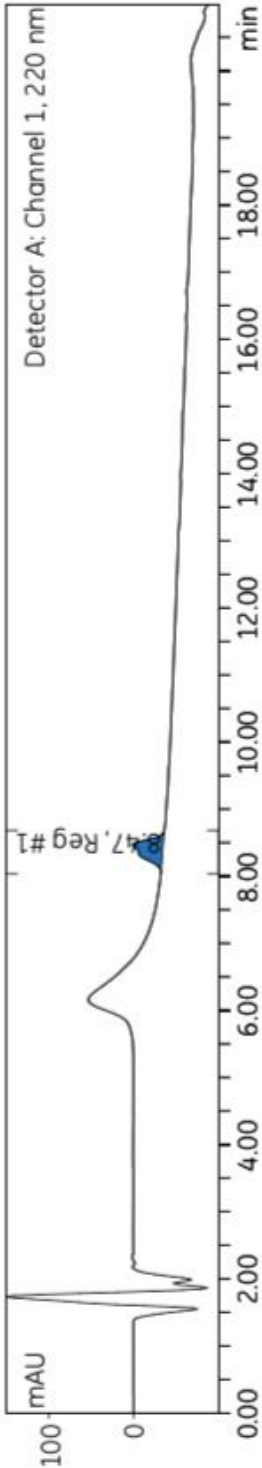
Annexe 3 : Étapes de synthèse du [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor



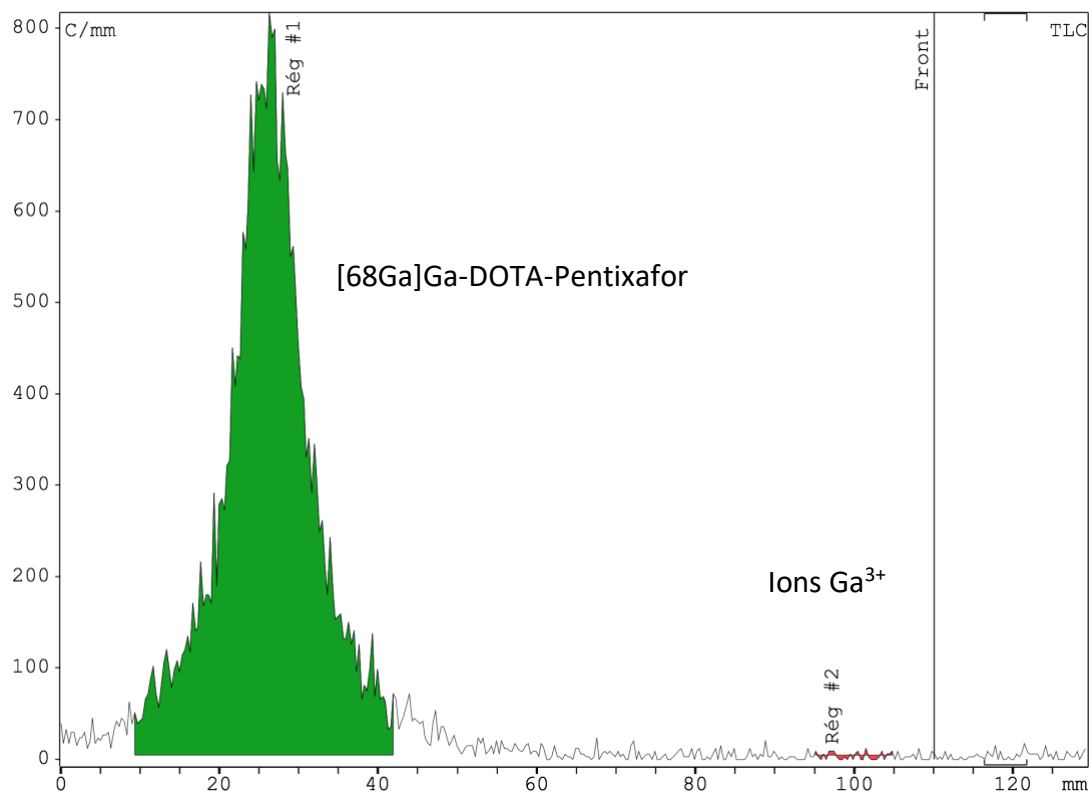
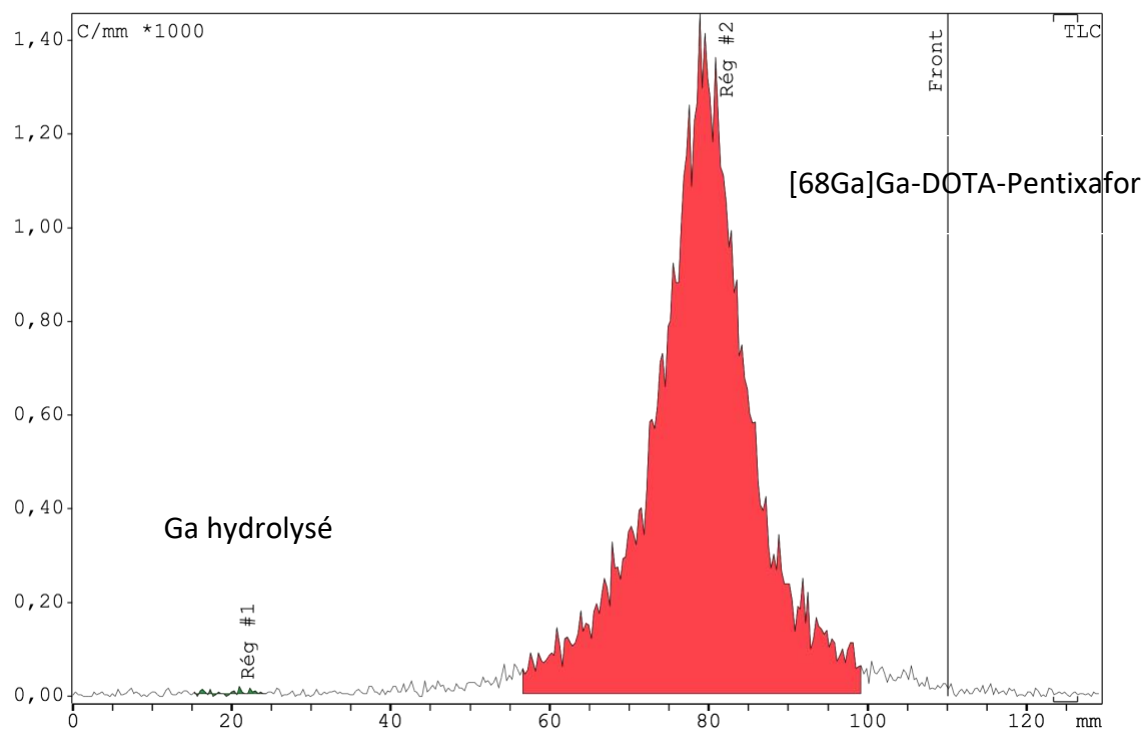
Annexe 4 : Récapitulatif des contrôles qualité de la solution de [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor

Test	Méthode	Critères d'acceptation
Caractères organoleptiques *	Examen visuel	Solution limpide et sans particules
Mesure de l'activité *	Chambre d'ionisation (Activimètre)	Report de l'activité mesurée et de l'heure de mesure
Identification du [68Ga]Ga- DOTA-Pentixafor *	HPLC	Temps de rétention : +/- 10% du T_{ref}
Pureté radiochimique *	CCM HPLC	> 95%
pH *	Bandelette colorimétrique	3,5 – 8,0
Endotoxines bactériennes *	LAL test (Endosafe®)	< 15 EU / mL (< 175 EU / flacon)
Identification radionucléidique du [68Ga] (Période physique)	Décroissance radioactive	62 – 74 min
Concentration en éthanol	CPG (Arronax)	< 10% du V_{final}
Stérilité	Ph. Eur. 2.6.1 / USP<71>	Ph. Eur. 2.6.1 / USP<71>
Pureté radionucléidique *	Chambre d'ionisation avant et après 48h de décroissance	< 0,001% de l'activité totale
* Tests réalisés uniquement en routine		

Annexe 5 : Chromatogrammes HPLC du lot 1 obtenus par le détecteur UV (graphe 1) et radiodétecteur (graphe 2)



Annexe 6 : Radiochromatogrammes du lot 1 obtenus par CCM avec le mélange ammonium / méthanol (graphe 1) et le citrate (graphe 2)



Vu, le Président du jury,

Pr. Mickaël BOURGEOIS

Vu, le Directeur de thèse,

Pr. Alain FAIVRE-CHAUVET

Vu, le Directeur de l'UFR,

Nom – Prénom : DUBÉGNY Constance

Titre de la thèse : [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor : un nouveau radiopharmaceutique pour la TEP

Résumé de la thèse :

Avec le déploiement de l'imagerie TEP, de nouveaux radiopharmaceutiques sont constamment en voie de développement en oncologie. Les récepteurs aux chimiokines sont une cible intéressante en oncologie car ils sont surexprimés dans plusieurs types de cancer et interviennent dans les phénomènes de dissémination tumorale. Ce travail présente la mise au point du radiomarquage d'un peptide, le Pentixafor, antagoniste de ces récepteurs, marqué au [68Ga]-Gallium. Afin de l'utiliser dans un essai clinique, le dossier du médicament expérimental de ce radiopharmaceutique a été rédigé et trois lots de validation de synthèse du [68Ga]Ga-DOTA-Pentixafor ont été réalisés. La méthode analytique de contrôle HPLC du produit fini a également été mise au point et validée. Les lots de validation se sont révélés conformes et le DME est en cours de soumission auprès des autorités compétentes.

MOTS CLÉS (6 maximum en majuscules, tous les mots clefs doivent être présents dans le résumé)

[68GA]GA-DOTA-PENTIXAFOR, RADIOPHARMACEUTIQUE, [68GA]-GALLIUM, DOSSIER DU MEDICAMENT EXPERIMENTAL, TEP, LOT DE VALIDATION

JURY

PRÉSIDENT : Mickaël BOURGEOIS, Professeur des universités - Praticien hospitalier, CHU de Nantes

DIRECTEUR : Alain FAIVRE-CHAUVET, Professeur des universités - Praticien hospitalier, CHU de Nantes

ASSESEUR : Franck LACOEUILLE, Maitre de conférences - Praticien hospitalier, CHU d'Angers

Mathieu FRINDEL – Dr en Pharmacie, Centre de cancérologie de l'Ouest

Cécile BOURDEAU – Dr en Pharmacie, Centre de recherche ARRONAX

Adresse de l'auteur : constance.dubegny@orange.fr