

# Thèse de Doctorat

**Chloé LAMESA**

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Biologie - Santé

Discipline : Biologie, Santé, Pharmacie  
Spécialité : Radiochimie  
Unité de recherche : INSERM U892

Soutenue le 04 décembre 2014  
Thèse N° :

## **Technique diagnostique en deux temps pour l'imagerie moléculaire en oncologie** Mise au point d'un anticorps bispécifique et études radiochimiques sur le marquage au <sup>68</sup>Ga

### JURY

Rapporteurs : **Denis GUILLOTEAU**, PU-PH, Université François Rabelais, Tours  
**Raphaël TRIPIER**, PU, Université de Bretagne Occidentale, Brest

Examineurs : **Jacques BARBET**, DR, CNRS, Nantes  
**Marie Dominique DESRUET**, PH, CHU de Grenoble  
**Amaury du MOULINET D'HARDEMARE**, MCU, Université Joseph Fourier, Grenoble

Directeur de Thèse : **Alain FAIVRE-CHAUVET**, PU-PH, Université Nantes Angers Le Mans, Nantes

Co-directeur de Thèse : **Catherine GHEZZI**, PU, Université Joseph Fourier, Grenoble

# REMERCIEMENT

---

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à tous les membres du jury pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de ce manuscrit et à l'intérêt qu'ils portent à ce travail

# SOMMAIRE

---

<b>Introduction</b> .....	15
<b>Revue bibliographique</b> .....	17
<b>Chapitre 1 : les vecteurs dans la technique de préciblage</b> .....	18
I Les anticorps.....	18
I.A Généralités sur les anticorps.....	18
I.A.1 Structure des anticorps	18
I.A.2 Caractéristiques fonctionnelles des anticorps	22
I.A.3 Détermination antigénique des anticorps	24
I.A.4 Interactions anticorps - antigènes	25
I.B Les anticorps monoclonaux.....	27
I.B.1 Production	27
I.B.2 Humanisation	28
I.B.3 Les anticorps monoclonaux en clinique	33
II Les anticorps radioconjugués pour l'imagerie TEP : application à l'oncologie.....	36
II.A Principe général de l'imagerie TEP.....	36
II.A.1 Émission du positon et interaction avec le milieu	36
II.A.2 Les radionucléides émetteurs de positons	37
II.A.3 La caméra TEP	38
II.A.4 La place de l'imagerie TEP en clinique	39
II.B L'immuno-TEP .....	42
II.B.1 Principe	42
II.B.2 Caractéristiques des cibles tumorales	42
II.B.3 Applications précliniques et cliniques	47
III Optimisation de l'immuno-TEP .....	53
III.A La taille du vecteur .....	53
III.A.1 Les scFv	53

## Sommaire

III.A.2	Les scFv multivalents	54
III.A.3	Les minibodies	55
III.B	La cible antigénique.....	57
III.B.1	L'antigène carcino-embryonnaire	58
III.B.2	L'antigène CD-22	59
III.C	Le radiomarquage .....	60
III.D	Les systèmes de préciblage.....	61
III.D.1	Principes des systèmes de préciblage	62
III.D.2	Applications des systèmes de préciblage en imagerie TEP	70
<b>Chapitre 2 : La radiochimie du <math>^{68}\text{Ga}</math> dans l'imagerie par préciblage.....</b>		<b>74</b>
I	Production du $^{68}\text{Ga}$ .....	74
I.A	Propriétés physiques du $^{68}\text{Ga}$ .....	74
I.B	Généralités sur les générateurs.....	75
I.B.1	Le principe d'équilibre physique d'un générateur	77
I.B.2	Les considérations pratiques	80
I.B.3	Les générateurs produisant des émetteurs de positons	81
I.C	Le générateur $^{68}\text{Ge} / ^{68}\text{Ga}$ .....	83
I.C.1	Les principes généraux de l'échange d'ions	84
I.C.2	Les matrices	85
I.C.3	Les générateurs commercialisés	87
II	Les chélatants du $^{68}\text{Ga}$ .....	90
II.A	Propriétés chimiques du $^{68}\text{Ga}$ .....	90
II.B	Propriétés biologiques du $^{68}\text{Ga}$ .....	90
II.C	Rappels généraux sur la chimie de complexation.....	91
II.C.1	La théorie HSAB	91
II.C.2	La stabilité des complexes	92
II.C.3	L'inertie cinétique des complexes	94
II.D	Les chélatants bifonctionnels.....	95
II.D.1	Les caractéristiques générales	95
II.D.2	Les techniques de conjugaison des CBF	96
II.D.3	Les chélatants macrocycliques	99
II.D.4	Les chélatants acycliques	104

III	Le radiomarquage du $^{68}\text{Ga}$ .....	109
III.A	Les contaminants de l'éluat de $^{68}\text{Ga}$ .....	109
III.A.1	Le $^{68}\text{Ge}$ .....	109
III.A.2	Les contaminants métalliques .....	111
III.B	Les techniques de purification de l'éluat.....	113
III.B.1	Le fractionnement .....	114
III.B.2	La chromatographie par échanges d'anions .....	116
III.B.3	La chromatographie par échange de cations .....	118
III.C	Les conditions de radiomarquage.....	120
III.C.1	Les tampons réactionnels .....	122
III.C.2	Les vecteurs .....	123
	<b>Partie expérimentale.....</b>	<b>125</b>
	<b>Objectifs du travail de thèse .....</b>	<b>126</b>
	<b>Chapitre 1 : synthèse des anticorps bispécifiques.....</b>	<b>128</b>
I	Matériels et méthodes.....	128
I.A	Matières premières.....	128
I.B	Matériels.....	128
I.B.1	Chromatographie liquide .....	128
I.B.2	Spectrométrie UV .....	129
I.B.3	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide .....	129
I.C	Méthodes.....	131
I.C.1	Comparaison des techniques de dosage par spectrométrie UV .....	131
I.C.2	Production des anticorps bispécifiques .....	131
I.C.3	Études d'affinités .....	136
I.D	Analyses statistiques .....	138
II	Résultats .....	139
II.A	Validation de la technique de dosage par spectrométrie UV.....	139
II.B	Production des AcBs.....	141
II.B.1	Études sur la synthèse d'AcBs à partir d'Acm humanisés .....	141
II.B.2	Production de l'AcBs murin F6 x 679 : Optimisation de la synthèse .....	146

II.C	Validation <i>in vitro</i> de l'AcBs F6 x 679 .....	147
II.C.1	Études sur l'immunoréactivité de l'AcBs .....	147
II.C.2	Étude de reconnaissance du motif HSGL par le versant 679 .....	147
III	Discussion .....	149
<b>Chapitre 2 : Études radiochimiques des complexes du <sup>68</sup>Ga.....</b>		<b>155</b>
I	Matériels et méthodes.....	155
I.A	Matières premières.....	155
I.B	Matériels.....	155
I.B.1	Chromatographie liquide .....	155
I.B.2	Mesure de la radioactivité .....	157
I.B.3	Radioprotection .....	157
I.C	Méthodes.....	158
I.C.1	Étude de poste .....	158
I.C.2	Description générale du protocole de synthèse des complexes .....	159
I.C.3	Calcul de l'osmolarité de la solution de complexes radiomarqués .....	162
I.C.4	Étude de la contamination par les métaux dans l'éluat de <sup>68</sup> Ga .....	163
I.C.5	Études des cinétiques de radiomarquage des chélatants avec le <sup>68</sup> Ga .....	165
I.C.6	Protocoles de radiomarquage des chélatants .....	166
I.C.7	Études des complexes dans la solution injectable .....	166
I.C.8	Études <i>in vitro</i> des complexes du <sup>68</sup> Ga dans le sang de souris .....	167
I.C.9	Études de biodistribution des complexes <i>in vivo</i> chez la souris .....	169
I.C.10	Analyses statistiques .....	170
II	Résultats .....	171
II.A	Apport du circuit et caractérisation du générateur .....	171
II.B	Études sur les techniques de purification de l'éluat de <sup>68</sup> Ga.....	175
II.B.1	Optimisation de la technique par échange cationique de OcaK .....	176
II.B.2	Optimisation de la méthode d'échange cationique de Mueller .....	179
II.B.3	Études des contaminants métalliques dans l'éluat purifié .....	185
II.C	Études de complexation des chélatants avec le <sup>68</sup> Ga .....	187
II.C.1	Cinétique de complexation du <sup>68</sup> Ga avec l'HBED .....	188
II.C.2	Cinétique de complexation du <sup>68</sup> Ga avec le DOTA .....	194
II.D	Études radiochimiques des complexes <i>in vitro</i> .....	198

## Sommaire

II.D.1	Études radiochimiques dans la solution injectable	198
II.D.2	Études radiochimiques dans le sang de souris	200
II.E	Études de biodistributions <i>in vivo</i> .....	203
III	Discussion .....	206
	<b>Discussion générale</b> .....	<b>216</b>
	<b>Conclusion et perspectives</b> .....	<b>220</b>
	<b>Références</b> .....	<b>223</b>
	<b>Annexe 1 : tableau des anticorps monoclonaux possédant une AMM</b> .....	<b>249</b>
	<b>Annexe 2 : tableau périodique des éléments</b> .....	<b>251</b>
	<b>Annexe 3 : résultats des biodistributions des complexes</b> .....	<b>252</b>

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

---

Figure 1. Action sur les Ac des enzymes protéolytique et des agents de réduction, (Kindt et al., 2008).....	19
Figure 2. Structure schématique d’une immunoglobuline de type G, (Hansel et al., 2010) ...	22
Figure 3. Illustration des différences observées pour les différentes sous classes Ig G (Kindt et al., 2008).....	23
Figure 4. Représentation des différentes fonctions effectrices des Ac (Baty et al., 2006).....	24
Figure 5. Représentation de la technique de l’hybridome (Kindt et al., 2008).....	28
Figure 6. Représentation de la production des Ac chimériques par génie génétique (Kindt et al., 2008).....	30
Figure 7. Représentation de l’obtention d’une librairie de gènes de fragments Fab.....	32
Figure 8. Représentation des Acm selon leur niveau d’humanisation, (Chardès, 2012).....	33
Figure 9. Représentation de l’émission d’un positon et réaction d’annihilation .....	37
Figure 10. Illustration de la variation de biodistribution d’un Ac due à la modification du vecteur (Andrew et al., 1988).....	43
Figure 11. Comparaison de l’efficacité de ciblage en fonction de la dose d’Ac injectée (Kraeber-Bodéré et al., 2003).....	46
Figure 12. Représentation des différents vecteurs en immuno-TEP.....	57
Figure 13. Représentation de la technique streptavidine-biotine (D’après Goldenberg, 2006).....	63
Figure 14. Représentation de la stratégie biotine-streptavidine-biotine (D’après Goldenberg, 2006).....	64
Figure 15. Représentation de la stratégie <i>Affinity Enhancement System</i> (D’après Goldenberg, 2006).....	65
Figure 16. Schéma de synthèse d’un F(ab’) <sub>2</sub> bispécifique par voie chimique.....	66
Figure 17. Schéma de synthèse de TriFab par le système DNL (D’après Rossi et al., 2006)....	67

## Table des illustrations

Figure 18. Réaction de Bezzoni-Staudinger (Knight et al., 2014).....	68
Figure 19. Exemple de réaction IDDA (Knight et al., 2014).....	69
Figure 20. Schéma de filiation simplifié du $^{68}\text{Ga}$ (d'après LNHB / CEA).....	75
Figure 21. Schéma d'élution d'un générateur $^{68}\text{Ge} / ^{68}\text{Ga}$ .....	76
Figure 22. Cinétique de transition pour un générateur $^{99}\text{Mo} / ^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Vertes et al., 2010).....	79
Figure 23. Cinétique séculaire pour un générateur $^{68}\text{Ge} / ^{68}\text{Ga}$ (Vertes et al., 2010).....	79
Figure 24. Réactions de conjugaison courantes entre un CBF et un vecteur.....	97
Figure 25. Représentation schématique des dérivés du DOTA.....	100
Figure 26. Représentation schématique du PCTA.....	101
Figure 27. Représentation schématique des dérivés fonctionnalisés du NOTA.....	102
Figure 28. Représentations schématiques du TRAP et du NOPO.....	103
Figure 29. Représentation schématique du depda et de ses dérivés.....	105
Figure 30. Représentation schématique du CP256.....	106
Figure 31. Représentation schématique de la DFO.....	106
Figure 32. Représentations schématiques des dérivés de l'HBED.....	107
Figure 33. Schéma des grandes étapes de la synthèse du $^{68}\text{Ga}$ DOTA-TOC (Meyer et al., 2004) .....	109
Figure 34. Représentation schématique du <i>N,N'</i> -( <i>o</i> -phénylène)dimaléimide (Sigma).....	134
Figure 35. Graphique des absorbances à 280 nm des gammes de concentration de la BSA, de la pepsine, l'AcM HLL <sub>2</sub> et le F(ab') <sub>2</sub> HLL <sub>2</sub> en fonction de l'appareil de mesure.....	140
Figure 36. Profil chromatographique des produits de l'HLL <sub>2</sub> digérés par 5 % de pepsine....	142
Figure 37. Profil chromatographique d'une solution d'AcBs HLL <sub>2</sub> x HLL <sub>2</sub> non purifié.....	144
Figure 38. Électrophorèse en condition non réductrice.....	145
Figure 39. Protocole CLHP pour les analyses du complexe DOTA- $^{68}\text{Ga}$ .....	156
Figure 40. Protocole CLHP pour les analyses du complexe HBED- $^{68}\text{Ga}$ .....	157
Figure 41. Schéma général du circuit d'élution du générateur $^{68}\text{Ge} / ^{68}\text{Ga}$ .....	159

## Table des illustrations

Figure 42. Schéma du circuit d'élution du générateur pour la pré-purification par échange anionique.....	161
Figure 43. Illustration du circuit d'élution du générateur $^{68}\text{Ge} / ^{68}\text{Ga}$ .....	171
Figure 44. Évolution de l'activité des générateurs au cours du temps.....	174
Figure 45. Évolution du rendement d'élution en fonction du volume de solvant.....	177
Figure 46. Évolution des rendements d'élution en fonction du volume total d'élution .....	178
Figure 47. Évolution du rendement en fonction de la concentration du solvant.....	181
Figure 48. Évolution du rendement d'élution en fonction du pourcentage d'HCl 5 M.....	182
Figure 49. Évolution du rendement d'élution en fonction du volume d'élution.....	183
Figure 50. Effet de la concentration du tampon sur le pH de la solution de marquage.....	184
Figure 51. Profil chromatographique du complexe HBED- $^{68}\text{Ga}$ .....	189
Figure 52. Évolution du rendement pour l'HBED- $^{68}\text{Ga}$ en fonction de la température.....	190
Figure 53. Profil chromatographique du complexe HBED- $^{68}\text{Ga}$ (HEPES, 95°C, 10 min).....	192
Figure 54. Comparaison des rendements en fonction de la quantité d'HBED .....	193
Figure 55. Profil chromatographique du DOTA- $^{68}\text{Ga}$ avec le protocole CLHP de l'HBED .....	194
Figure 56. Profil chromatographique de l'éluat seul avec le protocole CLHP du DOTA.....	195
Figure 57. Profil chromatographique de 230 µg de DOTA- $^{68}\text{Ga}$ .....	195
Figure 58. Illustration du composé complexé au $^{68}\text{Ga}$ lors de l'ajout de TCA. ....	201
Figure 59. Comparaison des biodistributions pour le HBED- $^{68}\text{Ga}$ à 10 min et 60 min .....	203
Figure 60. Comparaison des biodistributions pour le DOTA- $^{68}\text{Ga}$ à 10 min et 60 min .....	204
Figure 61. Représentations spatiales des isomères du complexe de l'HBED .....	211

# TABLE DES TABLEAUX

---

Tableau 1. Caractéristiques générales des classes d'Ig (d'après Kindt et al., 2008).....	21
Tableau 2. Nomenclature internationale des Acm tenant compte des cibles potentielles (d'après Scheen et al., 2009).....	34
Tableau 3. Les principaux radionucléides émetteurs de positons.....	38
Tableau 4. Comparaison des coûts des principales techniques d'imagerie médicale (Agence Internationale de l'Énergie Atomique (AIEA), 2010).....	40
Tableau 5. Caractéristiques principales des isotopes cliniques du Ga.....	74
Tableau 6. Générateurs disponibles pour l'imagerie TEP (d'après l'AIEA, 2010) .....	82
Tableau 7. Caractéristiques principales des générateurs commercialisés .....	87
Tableau 8. Caractéristiques des différentes méthodes de pré-purification .....	114
Tableau 9. Résultats des dosages de métaux et du <sup>68</sup> Ge pour le fractionnement .....	115
Tableau 10. Présentation des différents protocoles de pré-purification anionique .....	117
Tableau 11. Présentation des protocoles de pré-purification cationique .....	120
Tableau 12. Conditions générales de synthèse selon le tampon de la réaction.....	121
Tableau 13. Rendements de digestion de l'HLL <sub>2</sub> selon la quantité de pepsine .....	141
Tableau 14. Comparaison des surfaces des pics de F(ab') <sub>2</sub> avec et sans fragilisation.....	142
Tableau 15. Rendements de production des Fab' de l'HLL <sub>2</sub> en fonction du réducteur.....	143
Tableau 16. Résultats des essais de pH pour la formation des AcBs .....	146
Tableau 17. Estimations des paramètres pour le calcul des débits de dose .....	172
Tableau 18. Dose équivalente prise aux mains pour une synthèse.....	172
Tableau 19. Essai de purification de l'éluat par des tampons acides .....	179
Tableau 20. Comparaison des concentrations de métaux pour l'échange cationique.....	185
Tableau 21. Comparaison des concentrations de métaux pour le fractionnement .....	186
Tableau 22. Comparaison des concentrations de métaux pour l'échange anionique .....	186

## Table des tableaux

Tableau 23. Comparaison des méthodes par fractionnement et par échange anionique ....	187
Tableau 24. Résultats des cinétiques de complexation de l'HBED en acétate .....	190
Tableau 25. Résultats des cinétiques de complexation de l'HBED en HEPES .....	191
Tableau 26. Résultats des cinétiques de complexation du DOTA en acétate.....	196
Tableau 27. Résultats des cinétiques de complexation du DOTA en HEPES .....	197
Tableau 28. Résultats de la détermination de la lipophilie des complexes.....	198
Tableau 29. Résultats de la stabilité des complexes en solution injectable .....	199
Tableau 30. Résultats des études <i>in vitro</i> du complexe HBED- <sup>68</sup> Ga dans le sang.....	201
Tableau 31. Résultats des études <i>in vitro</i> du complexe DOTA- <sup>68</sup> Ga dans le sang .....	202

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

Ac : anticorps

AcBs : anticorps bispécifique

Acm : anticorps monoclonaux

AS : activité spécifique

PDM : *N,N'*-(*o*-phénylène)dimaléimide

CBF : chélatant bifonctionnel

CDR : *complementarity-determining region*

ACE : antigène carcino-embryonnaire

CLHP : chromatographie liquide haute pression

DNL : *Dock and Lock synthesis*

DOTA : acide 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacétique

DTPA : acide diéthylène triamine penta-acétique

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique

Fab : *fragment antigen binding*

Fc : *fragment cristallizable*

HBED : acide *N,N'*-bis[2-hydroxy-5-(carboxyéthyl)benzyl]éthylènediamine-*N,N'*-diacétique

Ig : immunoglobuline

Ka : constante d'affinité

Log( $\beta$ ) : constante de stabilité thermodynamique

NEM : *N*-éthylmaléimide

NHS : *N*-hydroxysuccinimide

PhE : Pharmacopée Européenne

RIT : radioimmunothérapie

TA : température ambiante

SCN : isothiocyanate

TEMP : tomographie par émission monophotonique

TEP : tomographie par émission de positons

UP : ultra-pure

# INTRODUCTION

---

## Introduction

Selon l'Institut National du Cancer, le cancer est aujourd'hui la première cause de mortalité chez la femme et la deuxième chez l'homme en France avec 355354 nouveaux cas estimés en 2012. Cette maladie multifactorielle et protéiforme est aujourd'hui un problème majeur de santé publique. Les pouvoirs publics ont lancé en 2003 le plan cancer dont « le but premier est de guérir plus de personnes malades ». A travers des objectifs de prévention et de diagnostic précoce, il soutient la recherche fondamentale et clinique pour l'amélioration de la prise en charge globale du patient. La recherche en médecine nucléaire oncologique rentre dans ce cadre à travers le développement de nouveaux médicaments de thérapie ciblée et / ou d'imagerie.

La tomographie par émission de positons (TEP) est une technique d'imagerie moléculaire non invasive étudiant la fonctionnalité des organes en complément des différentes techniques d'imagerie anatomique. Son indication principale à l'heure actuelle est le diagnostic en oncologie. Elle produit des images bi- ou tridimensionnelles après l'injection d'un médicament radiopharmaceutique ou traceur qui se distribue dans les différents organes selon son affinité, et dont la répartition sera détectée par une caméra grâce à l'émission de rayonnements ionisants. Les traceurs sont de types variés. L'une des voies de recherche dans ce domaine est l'utilisation de vecteurs immunologiques utilisables pour le diagnostic s'ils sont marqués avec un émetteur gamma ( $\gamma$ ) ou de positons ( $\beta^+$ ), et pour la radioimmunothérapie (RIT), s'ils sont marqués par un émetteur d'électrons ( $\beta^-$ ) ou alpha ( $\alpha$ ) : ils deviennent alors agent thérapeutique. L'objectif principal est donc l'individualisation du traitement pour répondre au plus juste à une maladie en perpétuelle mutation.

Ce principe, appelé le théranostic, est le fondement des travaux de l'équipe INSERM U892 dans laquelle ce travail a été réalisé. Leurs recherches sont basées sur une technique de vectorisation novatrice, le préciblage par *affinity enhancement system*. Dans ce cadre, le projet de thèse avait pour objectif l'étude de nouveaux traceurs pouvant servir à la fois en imagerie et en thérapie. Ce travail s'est subdivisé en deux parties. Dans une première partie, la production d'un vecteur immunologique permettant le préciblage a été réalisée et validée. Dans une seconde partie, une étude de radiochimie avec un émetteur  $\beta^+$ , le  $^{68}\text{Ga}$ , a été menée.

# REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

---

# CHAPITRE 1 : LES VECTEURS DANS LA TECHNIQUE DE PRÉCIBLAGE

---

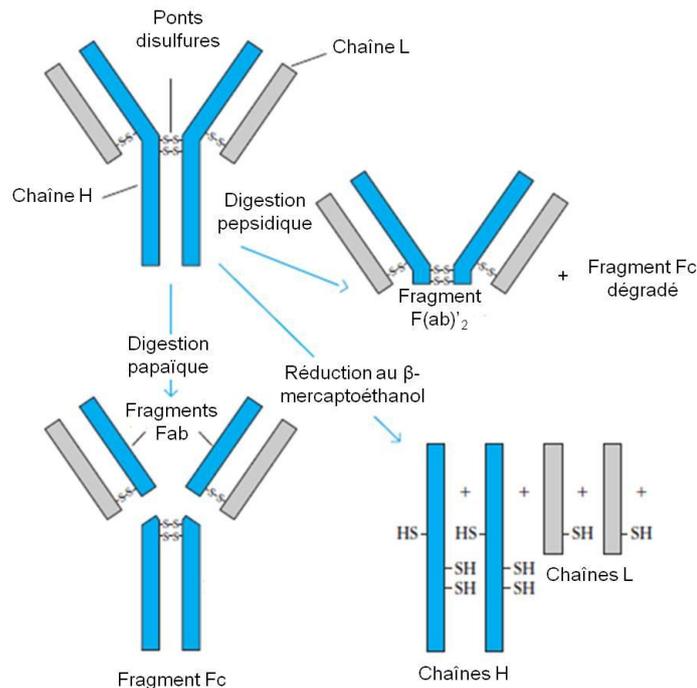
## I Les anticorps

### I.A Généralités sur les anticorps

#### I.A.1 Structure des anticorps

Les anticorps (Ac) appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (Ig). Les Ig sont les outils de reconnaissance de l'antigène utilisées par les lymphocytes B. Elles existent sous deux formes. La forme membranaire, appelée BCR (pour *B-cell receptors*) qui sert de récepteur spécifique des antigènes et qui est ancrée à la membrane. La forme sécrétée, l'Ac, produit par cette même cellule activée. Lors de réponse immunitaire, les Ac se lient aux pathogènes ou aux produits toxiques pour neutraliser leur action et permettre leur destruction par les cellules phagocytaires. Cette fonction de sécrétion des Ac par les lymphocytes B activés ou plasmocytes est décrite comme la principale fonction effectrice des lymphocytes B dans l'immunité adaptative.

La structure générale d'une Ig a été élucidée grâce à l'analyse d'un anticorps dans les années 60 (1,2). L'analyse par différentes digestions enzymatiques met en évidence que l'anticorps possède 2 fragments identiques de 45kDa contenant les sites de liaisons à l'antigène (Ag). Ils sont donc nommés Fab pour *antigen binding fragment*. Le troisième fragment pèse 50 kDa et ne contient pas de site de liaison à l'antigène. Il se cristallise lors de son stockage au froid. Il est appelé Fc pour *cristallizable fragment*. Une autre structure a également été mise en évidence, la partie F(ab')<sub>2</sub> (d'environ 100kDa) produite lors d'une digestion pepsique et qui correspond à un dimère de fragments Fab reliés entre eux par une petite région appartenant à la partie Fc et contenant des ponts disulfures. (fig. 1 (3))



**Figure 1. Action sur les Ac des enzymes protéolytique et des agents de réduction, (Kindt et al., 2008)**

A travers cette description expérimentale, les auteurs montrent que l'anticorps est une glycoprotéine hétérodimérique. Elle se compose de 4 chaînes polypeptidiques identiques 2 à 2. Les deux plus grosses seront appelées chaînes lourdes (H pour *heavy*) et les deux autres chaînes légères (L pour *light*). Les chaînes L de 22 kDa sont reliées chacune à une chaîne H par des ponts disulfures et des liaisons non-covalentes (liaisons hydrophobes ou hydrogènes notamment). Les deux chaînes H de 55 kDa sont liées l'une à l'autre par d'autres ponts disulfures présents en nombres variables dans la région charnière de l'Ac.

De plus, ces molécules sont glycosylées. La majorité des chaînes polysaccharidiques sont fixées à la partie Fc de l'Ac. Leur fonction n'est toujours pas clairement élucidée. L'absence de ces sucres entraîne une diminution de la concentration des Ac dans le sang et une perte partielle de la reconnaissance des Ac par les récepteurs présents sur les phagocytes et reconnaissant la partie Fc (4).

Les chaînes L sont composées de 211 à 217 aa. Sur leur moitié amino-terminale (N-ter), une forte variabilité de séquence a été mise en évidence. Cette région est appelée la région variable (V). Sur la partie terminale carboxylique (C-ter) en revanche, seules 2 séquences ont été retrouvées. Cette partie est nommée la région constante (C). Les 2 séquences représentent les 2 types possibles de chaînes L :  $\kappa$  et  $\lambda$ . La répartition chez l'homme est

d'environ 60% de chaînes  $\kappa$  pour 40% de chaînes  $\lambda$  produites par les lymphocytes B. A l'inverse chez la souris, 95% des chaînes L sont de type  $\kappa$ . Une molécule d'Ac contient un seul type de chaînes L,  $\kappa$  ou  $\lambda$ , mais jamais les 2 en même temps. Il existe de faibles différences de séquence peptidique sur le type  $\lambda$  entraînant 4 sous-types :  $\lambda 1$ ,  $\lambda 2$ ,  $\lambda 3$  et  $\lambda 4$ .

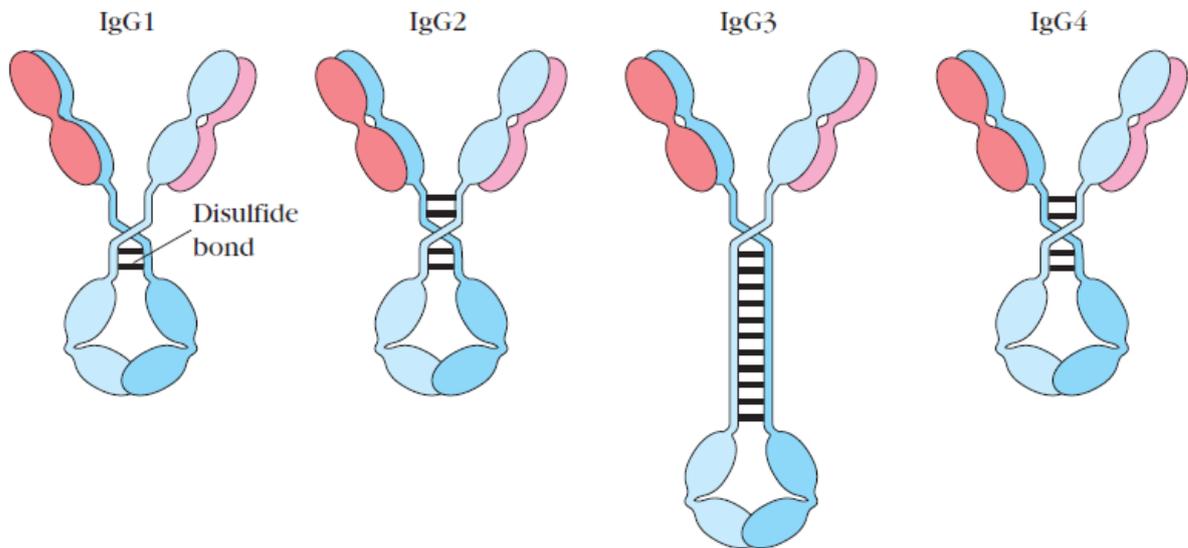
Les chaînes H possèdent un profil similaire aux chaînes L. Leur région N-ter (de 110aa environ) est variable alors que leur région C-ter est constante. La taille de la chaîne H dépend de sa région constante. Comme pour la région constante des chaînes L, il existe 5 séquences différentes  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$  pour les chaînes H. La région constante des types  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  fait 330 aa et 440 aa pour  $\mu$  et  $\epsilon$ . Chaque type de chaîne lourde définit la classe de la molécule d'Ac : IgM pour mu ( $\mu$ ), IgG pour gamma ( $\gamma$ ), IgA pour alpha ( $\alpha$ ), IgE pour epsilon ( $\epsilon$ ) et IgD pour delta ( $\delta$ ). Les IgG et les IgA possèdent des sous classes qui diffèrent par des modifications mineures au niveau de la composition en aa de leurs chaînes H. Il existe 4 sous-classes pour les IgG et 2 sous-classes pour les IgA. Les caractéristiques pour chaque classe sont détaillées dans le tableau 1 (3).

Classes	Ig M	Ig G	Ig A	Ig D	Ig E
Chaînes H	$\mu$	$\gamma$	$\alpha$	$\delta$	$\epsilon$
Sous classes	-	$\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3, \gamma 4$	$\alpha 1, \alpha 2$	-	-
Poids moléculaire (kDa)	900	150	150 à 600	150	190
Formes sériques	pentamère	monomère	de monomère à tétramère	monomère	monomère
Demi vie sérique (jours)	5	23 sauf IgG <sub>3</sub> 8 jours	6	3	2,5
Concentration (mg/mL)	1,5	0,5 - 9	0,5 - 3	0,03	0,0003
Proportion dans le sérum (%)	5-10	70 - 75	10 - 15	< 1	< 1
Localisation	membrane des lymphocytes B et sang	sang	sécrétions	membrane des lymphocytes B	sang
Rôles principaux	réponse primaire à un Ag, agglutination, active le complément	agglutination, lie les récepteurs au Fc des phagocytes	Défense des muqueuses, agglutination	rôle similaire aux IgM sécrétées	réaction d'hypersensibilité rôle anti-parasitaire

**Tableau 1. Caractéristiques générales des classes d'Ig (d'après Kindt et al., 2008)**

Du point de vue tridimensionnel, les régions variables et constantes de la molécule d'Ac possèdent plusieurs homologues de séquences entre les chaînes L et H d'environ 110 aa. Ces séquences sont appelées des domaines. Ils ont une structure globulaire grâce à la présence de liaisons intracaténaïres permettant le repliement sur environ 60 aa. Les chaînes L possèdent un domaine sur la région variable  $V_L$  et un domaine sur la région constante  $C_L$ . Les chaînes H possèdent un domaine variable  $V_H$  et plusieurs domaines constants  $C_H$  : trois pour les IgG, IgA, IgD et quatre pour les IgM et les IgE (fig. 2) (5).





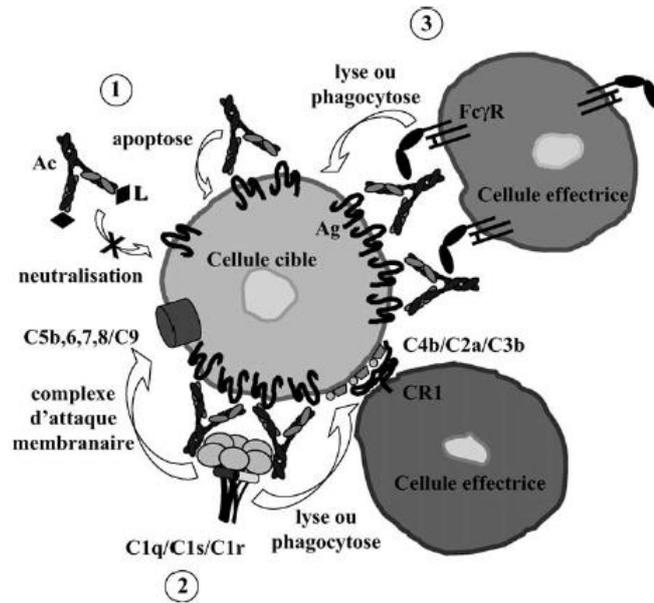
**Figure 3. Illustration des différences observées pour les différentes sous classes Ig G (Kindt et al., 2008)**

Au niveau fonctionnel, les domaines  $V_H$  et  $V_L$  possèdent une variabilité très importante sur la partie extérieure de leur structure globulaire. Ses régions hypervariables sont appelées CDR (*complementarity determining region*) (6). Ce sont elles qui reconnaissent l'Ag et qui se lient de façon spécifique sur une région particulière de l'Ag, l'épitope. Les domaines constants  $C_{H1}$  et  $C_L$  participent également à l'interaction de l'Ag avec l'Ac en allongeant les bras Fab des molécules d'Ac et en augmentant leur rotation. Ils stabilisent également la liaison de l'Ag avec l'Ac.

Les autres régions constantes des chaînes H,  $CH_2$  et  $CH_3$ , ont un rôle dans les fonctions effectrices médiées par les anticorps (fig. 4) (7). Elles permettent :

- la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des Ac (ADCC pour *Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity*) : l'Ac lié à une cellule cible se fixe au FcR de cellules cytotoxiques comme les *Natural Killer* (NK) et active la destruction de cette cellule cible par cytotoxicité (fig4 - 1).
- l'activation du complément (CDC pour *complement-dependent cytotoxicity*): les domaines  $CH_2$  se lient à la molécule C3b et activent la voie du complément. Cette cascade protéique aboutit à la formation de complexes enzymatiques qui perforent les membranes bactériennes, tuant ainsi le pathogène (fig4 - 2).

- l'opsonisation : les domaines CH2 et CH3 se lient au récepteur de la partie Fc (FcR) des neutrophiles et macrophages. L'antigène lié à l'Ac est phagocyté par ces cellules qui vont le « digérer » par lyse enzymatique et oxydation notamment (fig. 4 - 3).



**Figure 4. Représentation des différentes fonctions effectrices des Ac (Baty et al., 2006)**

(1) cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des Ac (ADCC) ; (2) l'activation du complément (CDC) ; (3) opsonisation

### I.A.3 Détermination antigénique des anticorps

Les Ac sont des glycoprotéines et, à ce titre, ce sont de puissants immunogènes. Plusieurs niveaux dans la détermination antigénique des Ac peuvent être décrits :

- l'isotypie qui correspond aux différentes classes de l'Ac. Au sein d'une espèce, chaque individu normal exprime tous les isotypes. Les isotypes sont donc conservés pour une même espèce. Dans le cas de l'injection d'un isotype d'une espèce à une autre, ceux-ci seront reconnus comme étrangers et entraîneront la sécrétion d'anticorps contre le déterminant isotypique. L'exemple le plus courant est la production d'anticorps anti-murins (HAMA, *human anti mouse antibodies*) lors de l'injection chez l'homme d'un traitement d'immunothérapie avec des anticorps produits chez la souris.

- l'allotypie qui correspond aux variations alléliques observées pour un groupe de gènes codant pour certains isotypes. Ces allotypes pourront entraîner des réactions

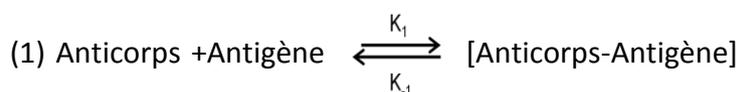
d'immunisation au sein d'une même espèce comme par exemple l'immunisation du fœtus contre sa mère ou encore lors de transfusions.

- l'idiotypie qui est le dernier niveau de la détermination antigénique des Ac. La production des CDR et leur fort niveau de diversité est le résultat de recombinaisons aléatoires de séquences limitées d'ADN conservées dans les gènes fonctionnels codant pour les chaînes L et H. Elles forment des millions de possibilités pour les CDR. Ce dernier degré est appelé idiotypie. Il caractérise l'originalité d'un Ac parmi la totalité de la production chez un même individu. On parle également d'Ac monoclonal (Acm).

Chaque Acm possède une spécificité de liaison avec l'antigène qui représente la spécificité de reconnaissance de l'Ac pour l'Ag. Plus le degré de spécificité est élevé, plus l'Ac se liera de façon sélective à l'Ag. Les épitopes reconnus uniquement par leur séquence primaire d'aa sont dits linéaires. Les épitopes formés de plusieurs séquences juxtaposées par leur forme spatiale sont dits conformationnels. Ils ne seront reconnus par l'Ac que si l'Ag n'est pas modifié dans sa structure. Cependant, les Ac peuvent reconnaître des épitopes conformationnels proches. Cette aptitude est appelée réaction croisée. La réaction croisée augmente le nombre d'Ag reconnu par un même Ac mais est également le mécanisme de base de pathologies telles que les maladies auto-immunes.

#### I.A.4 Interactions anticorps - antigènes

Chimiquement l'Ac se lie à l'Ag par des liaisons non covalentes et réversibles comme les ponts hydrogènes, les liaisons hydrophobes, électrostatiques ou de Van der Waals. Le pouvoir de l'Ac à se lier est défini par son affinité. L'affinité est décrite par l'équation (1) et s'exprime mathématiquement par la constante d'affinité  $K_a$  (2) :



$K_1$  : constante d'association

$K_{-1}$  : constante de dissociation

$$(2) K_a = \frac{K_1}{K_{-1}} = \frac{[\text{Anticorps-antigène}]}{[\text{Anticorps}][\text{Antigène}]}$$

Elle est définie par la facilité avec laquelle l'Ac va pouvoir se détacher de l'Ag. Plus le Ka est petit, plus l'affinité de l'Ac pour sa cible est grande. La valeur moyenne du Ka varie de  $10^7$  à  $10^{11} \text{ M}^{-1}$  chez l'homme.

L'application directe de cette grandeur en RIT est la sélection des vecteurs immuns d'intérêt. En effet, la quantité d'Ag présent n'étant pas modifiable, le Ka de l'Ac sera un facteur prépondérant dans la quantité d'Ac radioactifs à injecter et la distribution de la radioactivité dans l'organisme. Un Ac ayant un Ka très faible pour une cible aura par conséquent un fort index thérapeutique et sera intéressant pour la RIT vectorisée.

L'affinité est une grandeur théorique car en réalité, la plupart des Ac s'agrègent dans le sang. C'est le cas par exemple des IgM qui sont sous forme pentamérique. La valence de ces pentamères est donc de 10 et non de 2 comme pour les IgG. Pour évaluer la force de liaison d'un agrégat de plusieurs Ac pour des Ag, l'avidité est utilisée. Elle reflète la rapidité de formation du complexe Ac-Ag. Elle prend donc en compte l'affinité de chaque paratope et également le nombre de paratopes. Concrètement, plus le nombre de sites de reconnaissance est grand, plus l'avidité de l'Ac est importante. Ainsi, bien que les IgM soient moins affins que les IgG pour une même cible, ils auront une avidité beaucoup plus grande.

Ces deux grandeurs auront un impact important pour l'utilisation de techniques d'analyses utilisant des Ac. L'équilibre formé par le complexe immun (Ac-Ag) va donc dépendre des propriétés de l'Ac utilisé.

Dans l'organisme, il existe de très nombreux clones de lymphocytes B ayant une spécificité antigénique différente. Lors d'une agression de l'organisme par un agent étranger, une multitude de ces clones vont être activés. Chacun d'eux reconnaît un déterminant antigénique unique présent sur l'Ag. L'Ag va ainsi être reconnu par plusieurs clones. La multiplicité des clones de lymphocytes B reconnaissant un même Ag est appelée polyclonalité. Elle permet à l'organisme de répondre efficacement à un éventail d'antigènes de façon quasi illimitée.

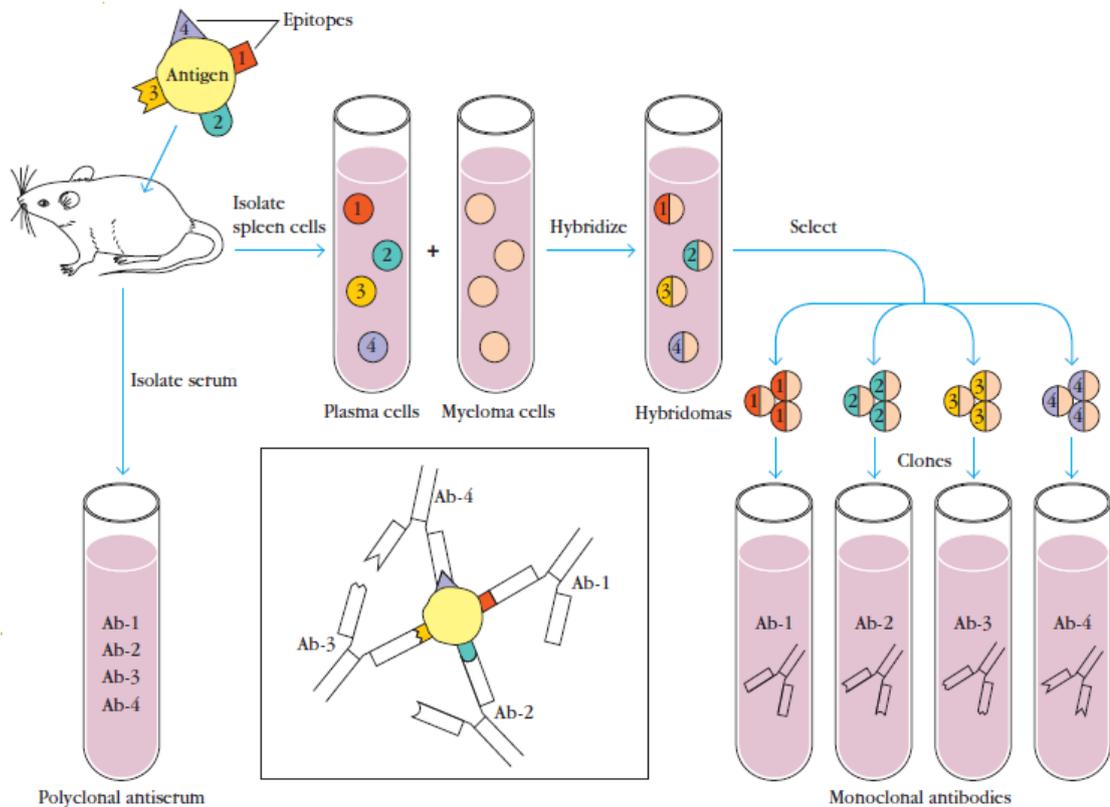
L'Ag est une molécule qui se lie de façon spécifique un Ac ou à un récepteur de surface. Il peut être de différentes natures (peptidique, saccharidique ou lipidique) et de différentes tailles. Dans la plupart des cas, l'Ag est immunogène, c'est-à-dire qu'il possède la capacité d'induire une réaction immunitaire. Cependant certains Ag ne sont pas directement

immunogènes, ce sont les haptènes. Il peut s'agir de peptides de petites tailles (< 5000 Da), de sels de métaux ou de molécules chimiques. Pour engendrer une réaction immunitaire, elles doivent être présentées par une macromolécule. A des fins de production industrielle ou de recherche, de nombreuses molécules d'haptènes sont couplées à des molécules porteuses qui les rendent accessibles au système immunitaire et leur confèrent un pouvoir immunogène. Dans ce cas, il peut apparaître des Ac anti-haptène.

## **I.B Les anticorps monoclonaux**

### **I.B.1 Production**

Les premiers anticorps utilisés en biochimie et en médecine pour le diagnostic ou la thérapie étaient produits à partir de séras de mammifères immunisés. Ces anticorps polyclonaux avaient une spécificité et une affinité pour l'Ag très variables d'une production à l'autre ce qui limitait leur utilisation. L'utilisation d'Acm était impossible car aucune technique ne permettait de les purifier. Les biochimistes se sont alors penchés sur des patients atteints de myélome multiple. Le myélome est un cancer hématologique où des clones de plasmocytes se multiplient dans la moelle osseuse développant des lésions ostéolytiques. Ces clones sécrètent des Acm en très grande quantité. Etant dirigés contre des Ag inconnus, ils ne pouvaient pas être utilisés en clinique mais ils ont été à l'origine des travaux de C. Milstein et G. Köhler sur la production d'Acm. En 1975, ces auteurs décrivent une nouvelle technique de préparation d'Acm à partir de la fusion d'un lymphocyte B normal activé et d'un plasmocyte de myélome (8). Cette nouvelle cellule, appelée hybridome, possède les capacités d'immortalité du plasmocyte cancéreux et de sécrétion du lymphocyte B normal. Ces cellules à fort pouvoir de division, peuvent être cultivées et produire en grande quantité un Acm dirigé contre un Ag spécifique (fig 5) (3).



**Figure 5. Représentation de la technique de l'hybridome (Kindt et al., 2008)**

L'invention des hybridomes par C. Milstein et G. Köhler a été récompensée par le prix Nobel de Médecine en 1984. Cette découverte a ouvert la voie à l'utilisation des Acm en clinique. Onze ans après la description de cette technique, le premier Acm (autorisation du Muromomab, 1986) a été approuvé par les autorités de santé américaines pour l'utilisation chez l'homme comme agent thérapeutique.

## I.B.2 Humanisation

Avec l'arrivée des Ac en clinique dans les années 80 (9), plusieurs problèmes ont été mis en évidence dont le plus important était l'immunogénicité des anticorps murins qui limitait leur utilisation chez l'homme.

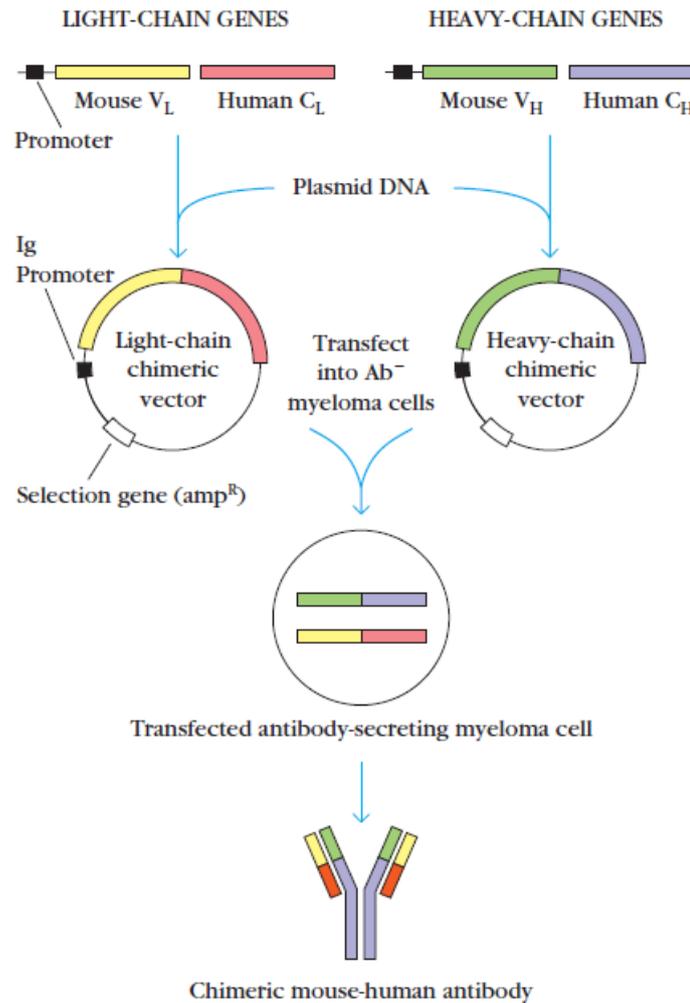
Plusieurs facteurs sont à l'origine des réactions observées lors de l'injection d'une solution d'Acm. De nombreux épisodes pseudo-grippaux (fièvres, courbatures, crampes) ainsi que des réactions inflammatoires au point d'injection ont été décrits. La formation

d'agrégats lors de l'injection, les adjuvants présents dans les solutions, la co-médication ou le statut immunologique du patient sont des facteurs indépendants de l'intolérance du patient à l'injection du produit. Cependant, l'immunogénicité des Acm produit à partir des hybridomes de souris/rat a été soulignée comme un facteur majeur des réactions chez l'homme. La réaction d'hypersensibilité engendrée est de type 3 et entraîne la production d'HAMA. Le pourcentage de survenue de cet évènement est très faible (0,1-0,2%) mais ses conséquences cliniques sont importantes (10). Les HAMA forment des complexes immuns avec l'Ac thérapeutique et bloquent son action, le rendant inefficace. Des réactions de type anaphylactique sont également possibles engageant alors le pronostic vital du patient.

De très nombreuses recherches ont donc été menées sur les modifications de structure de l'Ac afin de le rendre moins, voir non immunogène. L'une des propositions fut l'utilisation d'hybridomes humains utilisant des clones de plasmocytes humains fusionnés avec des cellules de myélomes. Cependant, la fusion de ces deux types cellulaires était difficile et la production d'Acm était faible (11).

### ***I.B.2.a Les anticorps chimériques***

Les premières descriptions de la modification de structure des Ac date de 1984 (12,13). La technique consiste à fusionner un gène des parties variables d'Acm de souris avec un exon de partie constante d'Ac humain. L'Ac ainsi produit possède l'affinité de l'Acm original murin mais avec une immunogénicité beaucoup moins importante grâce à la présence des domaines constants de chaînes H humaine (fig. 6) (14).



**Figure 6. Représentation de la production des Ac chimériques par génie génétique (Kindt et al., 2008)**

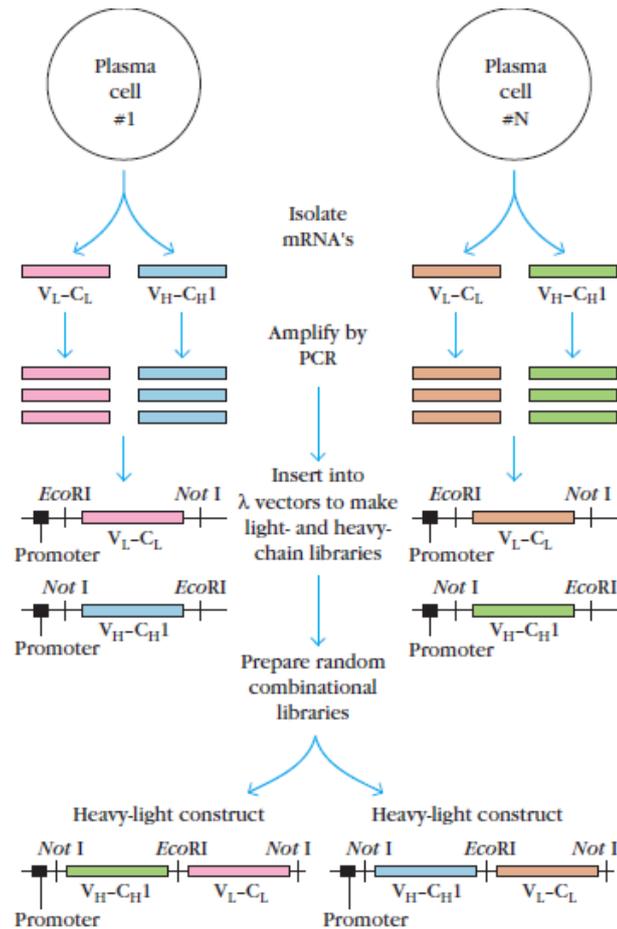
Ces anticorps dit chimériques représentent environ 15% des Ac commercialisés à l'heure actuelle (15). Bien que moins immunogènes, ils peuvent également provoquer des réactions immunitaires de type 3 lié aux domaines variables murins. Des anticorps anti-anticorps chimériques (HACA) ont été décrits (16–18).

### **I.B.2.b Les anticorps humanisés**

Toujours dans l'objectif de réduire l'immunogénicité, seuls les CDR de domaines V d'Ac de souris ont été fusionnées avec des exons de gènes de domaines V et C d'Ac humains (19). Dans ce cas, les Ac sont dit humanisés et représentent environ 45% des Ac actuellement commercialisés ou en essais de phase 3 clinique (20).

L'humanisation des AcM par la méthode de greffage de CDR murin montre cependant des limites importantes. Les régions CDR sont entourées par 2 régions moins variables, les régions Fr (Fr pour *framework regions*). Les régions Fr participent également à la reconnaissance de l'Ag mais leur rôle principal est structural. Elles permettent de maintenir un agencement tridimensionnel correct des régions CDR. L'adjonction des CDR sans les Fr rendent le paratope de l'Ac moins structuré et la liaison avec l'Ag moins efficace. L'AcM produit est donc moins affiné pour sa cible.

Pour répondre à ce problème et dans le but d'améliorer le répertoire d'Ac, des bibliothèques de combinaisons aléatoires de régions variables et constantes ont été construites (21,22). Elles utilisent différentes méthodes de mutagenèse aléatoire ou de PCR (*polymerase chain reaction*) randomisées (21–23) (fig. 7, (14)). La diversité des combinaisons est comparable au répertoire humain avec plus de  $10^{10}$  possibilités. De plus, ce type d'approche offre la possibilité d'obtenir des Ac spécifiques sans immunisation préalable. La diversité produite est également l'inconvénient majeur de ces techniques. Pour choisir les AcM ayant une affinité suffisante, des sélections par la technique du phage display restent incontournables et compliquent le procédé.



**Figure 7. Représentation de l'obtention d'une librairie de gènes de fragments Fab (Kindt et al., 2008)**

### I.B.2.c Les anticorps humains

Dans la continuité de cette démarche d'humanisation, les techniques de PCR randomisées ont également été décrites pour la production d'Ac humain (24). La création de souris transgéniques a également été proposée. Succinctement, les cellules souches embryonnaires murines sont rendue silencieuses pour les gènes codant pour les chaînes L et H des immunoglobulines. Ces gènes sont remplacés par des mini-gènes codant pour des séquences humaines. Puis ces cellules modifiées sont réintroduites dans l'embryon d'une souris hôte. Par croisements successifs, les souris transgéniques sont ensuite sélectionnées. Lors de l'immunisation de ces souris, les Ac produits seront humains.

### I.B.3 Les anticorps monoclonaux en clinique

#### I.B.3.a Nomenclature

Le développement du génie génétique permet aujourd’hui la production des Acm par diverses lignées cellulaires. Les systèmes d’expression les plus utilisés sont les cellules de mammifères (notamment la lignée CHO, lignée de cellules ovariennes de hamster chinois) où la production d’Acm est similaire à la production industrielle d’érythropoïétines recombinantes ou de facteur VII recombinant. La production par d’autres types cellulaires (plantes ou cellules d’insectes), par des bactéries ou des levures reste, comme l’élevage de souris transgéniques, peu employée au niveau industriel (25).

Les anticorps monoclonaux sont aujourd’hui largement utilisés en thérapeutique dans des domaines aussi divers que la cancérologie, l’infectiologie ou les maladies inflammatoires. L’OMS a donc mis en place une nomenclature internationale par segment clé pour les dénominations communes internationales des Acm (26,27). L’ensemble de cette codification est présenté dans le tableau 2 ((27)). Une représentation des différents niveaux d’humanisation des Acm est illustrée par la figure 8.

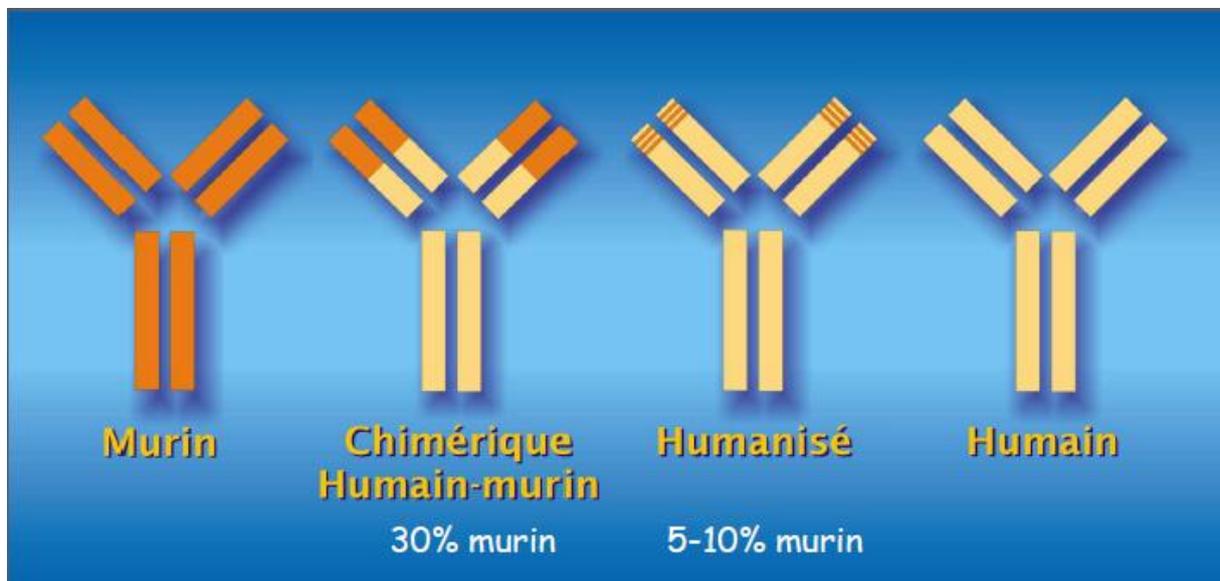


Figure 8. Représentation des Acm selon leur niveau d’humanisation, (Chardès, 2012)

Préfixe	Cibles	Source du produit	Suffixe	
<b>variable</b>	bactériennes	-ba(c)-		
	virales	-vi(r)-		
	immunitaire	-li(m)-		
	infection	-le(s)-		
	os	-o(s)-	humain	-u-
	musculo-squelettique	-mu(l)-	rat	-a-
	cardio-vasculaire	-ci(r)-	hamster	-e-
	interleukine	-ki(n)-	primate	-i-
	système nerveux	-neu(r)-	souris	-o-
	toxine	-tox(a)-	chimérique	-xi-
	tumeur colique	-co(l)-	humanisé	-zu-
	tumeur testiculaire	-go(t)-	hybride rat/murin	-axo-
	tumeur ovarienne	-go(v)-		
	tumeur mammaire	-ma(r)-		
	mélanome	-me(l)-		
	tumeur de la prostate	-pr(o)-		
tumeur diverse	-tu(m)-			

**Tableau 2. Nomenclature internationale des Acm tenant compte des cibles potentielles (d'après Scheen et al., 2009)**

### **I.B.3.b Utilisations cliniques**

Les Acm sont largement utilisés en clinique et des centaines de nouveaux produits sont en cours de développement. En France, 30 anticorps sont commercialisés. Le premier d'entre eux fut le muromomab en 1986, 11 ans après la découverte de l'hybridome. En 2002, l'adalimumab fut le premier anticorps totalement humain commercialisé. Aujourd'hui, 9 Acm humains sont autorisés par l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM). L'ensemble des anticorps monoclonaux commercialisés et leurs indications est présenté dans l'annexe 1.

Comme nous l'avons vu à travers la nomenclature, les champs d'application des Acm thérapeutiques sont très larges (15). Plus de 500 Acm thérapeutiques sont en cours d'évaluation. Leur mode d'action global est encore mal connu cependant plusieurs classes d'Acm thérapeutiques se distinguent :

- les Acm cytotoxiques, majoritairement des IgG, produisent une action de lyse sur la cellule cible (action directe, ADCC, CDC). Bien que l'action cytotoxique des Acm soit difficilement évaluable, plusieurs Acm sont commercialisés dans ce but. Le

plus représentatif d'entre eux est le rituximab (Mabthéra®) anticorps chimérique anti-CD20. Il est indiqué dans les hémopathies malignes B et certaines maladies auto-immunes (28).

- les Acm antagonistes se fixent sur un récepteur membranaire spécifique et bloquent la liaison avec leur ligand et / ou la voie de signalisation. C'est le cas du trastuzumab (Herceptin®), anticorps humanisé anti-HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) indiqué dans les cancers du sein et les cancers gastriques métastatiques surexprimant HER-2 (29).
- les Acm neutralisant se lient à des molécules solubles ou des antigènes particuliers (virus) et bloquent ainsi leur action. La plupart des Acm ont une indication dans les maladies immunitaires ou les infections virales (5). Plus particulièrement en oncologie, le bevacizumab (Avastin®), anticorps humanisé anti-VEGF (*vascular endothelial growth factor*) est l'Acm neutralisant le plus utilisé, indiqué en association avec d'autres chimiothérapies dans les cancers métastatiques du sein, du colon, du rectum, du rein, de l'ovaire, du péritoine et le cancer pulmonaire non à petites cellules (30).

Enfin, les Acm peuvent également être utilisés comme des vecteurs. Un vecteur est une molécule qui n'est pas utilisée pour son action thérapeutique mais qui servira de véhicule pour une autre molécule. Le principe repose sur l'utilisation d'anticorps comme vecteur pour la délivrance ciblée d'autres molécules exerçant un effet thérapeutique sur leur site d'action. Ils peuvent être couplés à des toxines, des enzymes, des chimiothérapies ou encore des radionucléides. En cancérologie, ils représentent plus de 50% des essais en phases cliniques précoces et 33% des anticorps en phase III (31). En Europe, 2 anticorps conjugués à des chimiothérapies ont été approuvés en 2012, l'Adcetris® et le Kadcylla®. En médecine nucléaire, deux anticorps à visée diagnostique le Leukoscan® et le Scintimum® conjugué au technécium-99 métastable ( $^{99m}\text{Tc}$ ) sont également approuvés. Enfin le Zévalin® anticorps conjugué à l'yttrium-90 ( $^{90}\text{Y}$ ) est également autorisé dans le traitement des lymphomes folliculaires.

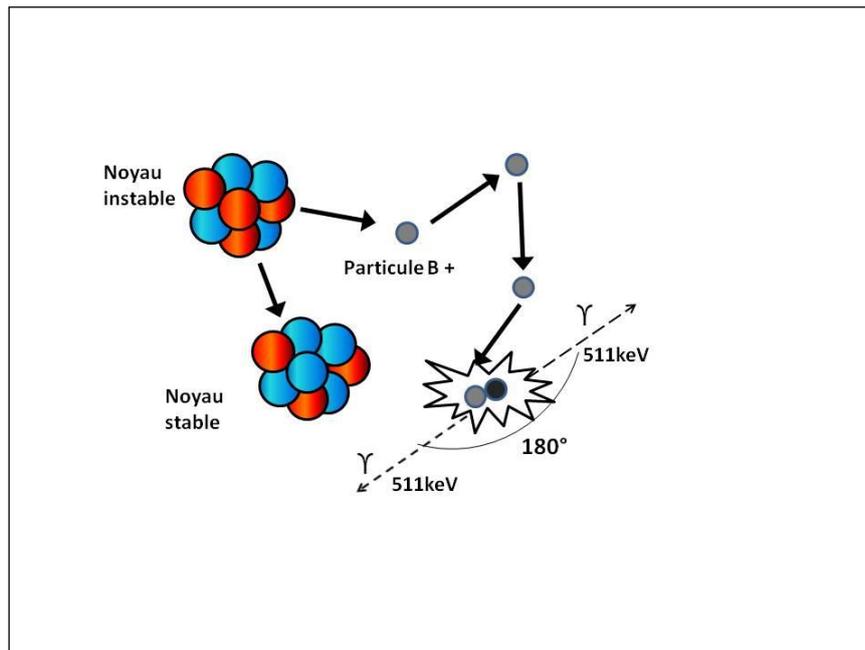
Les anticorps conjugués sont une voie de recherche importante à l'heure actuelle. En médecine nucléaire, malgré une faible proportion de médicaments commercialisés, de nombreuses équipes travaillent au développement de nouveaux vecteurs en imagerie, essentiellement en TEP pour l'oncologie et en RIT.

## **II Les anticorps radioconjugués pour l'imagerie TEP : application à l'oncologie**

### **II.A Principe général de l'imagerie TEP**

#### **II.A.1 Émission du positon et interaction avec le milieu**

L'émission d'un positon ou particule  $\beta^+$  est induite par la désintégration du noyau d'un élément père instable vers un élément fils plus stable. L'instabilité du noyau père est due à un excès de protons. Par échange d'énergie, le noyau convertit alors un proton en neutron et émet dans le même temps, vers l'extérieur, un positon. Le positon est une particule ayant la même masse que l'électron mais de charge opposée. Durant son parcours, il est freiné par le milieu environnant (dans le cas de la médecine nucléaire, les tissus du patient) jusqu'à perdre toute son énergie cinétique. Lors de son arrêt, il interagit avec un électron du milieu et s'annihile en créant deux photons  $\gamma$  de 511 keV (loi de conservation des masses) qui seront émis à  $180^\circ$  l'un de l'autre (fig. 9).



**Figure 9. Représentation de l'émission d'un positon et réaction d'annihilation**

Seuls ces photons dits d'annihilation détectés en coïncidence seront pris en compte par les détecteurs. La ligne de coïncidence ainsi produite permettra la localisation de la source de l'émission et la production d'une image.

En réalité, le trajet parcouru par le positon peut être de plusieurs millimètres et la colinéarité des photons émis n'est pas totale. Ces phénomènes sont à l'origine d'une dégradation de la résolution spatiale du système lors de la reconstruction de l'image.

## II.A.2 Les radionucléides émetteurs de positons

La découverte de la transformation nucléaire de l'aluminium-27 en phosphore-30 par le bombardement de particules à haute énergie issues d'une source de polonium fut à l'origine de toute la recherche sur de nouveaux isotopes artificiels. Elle valut à F. Joliot et I. Joliot-Curie le prix Nobel de Chimie en 1935 (32) et permit d'ouvrir la voie à l'emploi d'isotopes à des fins scientifiques et médicales. Aujourd'hui, les émetteurs de positons utilisés en Médecine Nucléaire sont tous artificiels. Le nombre d'isotopes disponibles en clinique reste cependant restreint et ils font l'objet d'une recherche intensive dans l'élargissement de leur utilisation. Le tableau 3 présente les principaux radionucléides utilisés en imagerie nucléaire.

Les correspondances des symboles chimiques avec le tableau périodique des éléments sont présentées en annexe 2.

Radionucléides	demi-vie (heures)	$\beta_{\text{max}}$ (MeV)	ratio $\beta +$ (%)
<sup>68</sup> Ga	1,1	1,9	89
<sup>18</sup> F	1,8	0,63	97
<sup>64</sup> Cu	12,7 h	0,66	18
<sup>86</sup> Y	14,7 h	3,15	34
<sup>89</sup> Zr	78,4 h	0,90	23
<sup>124</sup> I	100,2 h	2,14	24

**Tableau 3. Les principaux radionucléides émetteurs de positons**

Le choix du radionucléide repose essentiellement sur sa demi-vie. Plus la cinétique du traceur sera lente, plus la demi-vie de celui-ci devra être longue. La radiochimie des radionucléides est également un facteur de choix dans leur utilisation. Elle influe essentiellement sur la distribution du traceur et sera évoquée plus spécifiquement pour les vecteurs immunologiques au chapitre III. La disponibilité du radionucléide est également un élément à prendre en considération. En effet, plus l'émetteur est difficile à produire, plus le coût d'achat sera élevé pour les services. De même, la fréquence de production de l'isotope pourra également impacter son utilisation. Enfin la dosimétrie pour le patient ainsi que la radioprotection du personnel seront également à évaluer.

### II.A.3 La caméra TEP

Dans le cas majoritaire d'une détection indirecte des rayons gamma, la mesure d'un évènement en TEP correspond à la détection par les scintillateurs de deux photons d'annihilation de 511 keV émis en coïncidence. La détection de coïncidence se définit par la détection de deux évènements comptés dans un intervalle de temps très court et à 180° l'un de l'autre. Le scintillateur est un matériel intermédiaire qui est couplé à des photomultiplicateurs.

Lors de l'arrivée d'un photon  $\gamma$  incident sur la chaîne de détection, celui-ci excite les atomes ou les molécules constituant le scintillateur. Il en résulte l'émission de photons

lumineux. Plus précisément, deux phénomènes distincts sont produits lors de cette incidence. Le premier est l'absorption d'une partie de l'énergie (diffusion Compton) ou la de la totalité de l'énergie du photon  $\gamma$  (effet photoélectrique). L'absorption entraîne l'excitation et l'ionisation des atomes ou des molécules *in situ*. Le deuxième est la production des photons lumineux lors de la désexcitation de ces atomes ou de ces molécules (33). Les photons lumineux vont ensuite être convertis en signal électriques grâce aux photodétecteurs : les photons lumineux sont absorbés par la photocathode d'un tube photomultiplicateur qui émet des électrons de façon proportionnelle à leur énergie. Par un système de diodes, ces électrons seront amplifiés jusqu'à atteindre l'anode du tube. A l'anode apparaît une impulsion électrique qui est analysée par un système électronique d'acquisition. La discrimination en temps dépend du circuit de coïncidence. Il relie deux détecteurs en vis-à-vis bloquant ainsi l'arrivée d'un photon isolé. Seuls les photons d'annihilation mesurés à quelques nanosecondes d'intervalle (fenêtre de coïncidence) entre les deux détecteurs seront pris en compte comme un événement et serviront à la production de l'image.

#### **II.A.4 La place de l'imagerie TEP en clinique**

Dans la pratique, la tomographie d'émission monophotonique (TEMP) reste la technique la plus utilisée en médecine nucléaire. Elle utilise des émetteurs de photons  $\gamma$ . Le plus utilisé d'entre eux est le  $^{99m}\text{Tc}$  produit par un générateur  $^{99}\text{Mo} / ^{99m}\text{Tc}$  facilement disponible dans les centres de médecine nucléaire.

La TEMP et la TEP ont de nombreux points communs. Elles s'appuient toutes les deux sur la détection de photons  $\gamma$  et les étapes de reconstruction de l'image sont très similaires. Ces photons  $\gamma$  ont une certaine probabilité d'être absorbés (phénomène d'atténuation) ou d'être déviés (phénomène de diffusion) de leur trajectoire selon le matériau qu'ils traversent et leur énergie d'émission. L'atténuation par le milieu va diminuer le nombre de photons détectés provoquant une diminution du rapport signal sur bruit de fond et une modification des contrastes. Les photons diffusés vont quant à eux engendrer du bruit de fond et induire des erreurs dans la localisation. Pour limiter ces phénomènes, les caméras sont munies de systèmes de collimation. La TEMP possède une collimation mécanique qui bloque les

photons n'arrivant pas au détecteur avec le bon angle. La TEP utilise une collimation électronique reposant à la fois sur l'angle d'arrivée du photon sur le détecteur et sur le principe de la détection en coïncidence. De ce fait, la TEP possède une meilleure résolution, une plus grande sensibilité et un meilleur contraste que la TEMP.

Cependant, l'indication de la TEP reste limitée par son coût, notamment d'infrastructure avec la production des radionucléides émetteurs  $\beta +$  par des cyclotrons proches du lieu d'utilisation. Comme pour le  $^{99m}\text{Tc}$ , le développement des générateurs de radionucléides  $\beta +$  va permettre la production de différents médicaments radiopharmaceutiques *in situ*, rendant les services indépendants vis-à-vis des cyclotrons industriels. L'appareil est également un investissement important pour le service. L'innovation technique liée aux détecteurs de haute sensibilité (nouveaux types de cristaux, amélioration des algorithmes de reconstruction) et à l'apparition d'appareils ayant une fonction scanner ou tomodynamomètre (TEP-TDM), pour acquérir de façon simultanée localisation anatomique et fonctionnalité augmente le prix d'achat. Le tableau 4 présente une évaluation du coût pour différentes procédures d'imagerie (34).

Imagerie	Equipement (€*1000)	Implantation (€*1000)	Coût annuel (€*1000)	Consommables (€)	Nombres d'examens annuels / appareils	Prix par examen (€)
<b>TEP-scan</b>	2200	750	1177	400	2000	996
<b>TEMP</b>	490	60	419	50	2000	262
<b>IRM</b>	975	250	720	40	3000	234
<b>Scanner</b>	750	100	572	30	5000	103
<b>échographie</b>	135	-	144	40	2000	91

**Tableau 4. Comparaison des coûts des principales techniques d'imagerie médicale (Agence Internationale de l'Énergie Atomique (AIEA), 2010)**

La dernière avancée technologique dans ce domaine est l'adjonction d'une IRM à la place d'un scanner. Le prix de ces appareils est deux à trois fois celui d'une TEP-TDM. Les études médico-économiques sont en cours et peu de données sont disponibles à l'heure actuelle (35).

Aujourd'hui, la TEP est devenue un élément diagnostique incontournable dans l'exploration des cancers. Elle continue, malgré un prix qui reste élevé, à être l'une des techniques de référence en oncologie et poursuit son développement comme substitut de la TEMP essentiellement en neurologie.

## **II.B L'immuno-TEP**

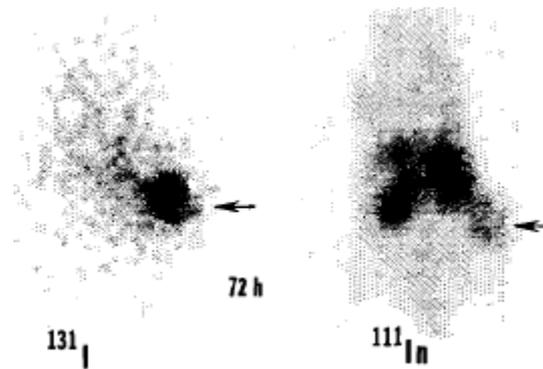
### **II.B.1 Principe**

L'immuno-TEP repose sur l'utilisation d'un vecteur immunologique marqué avec un radionucléide émetteur de positons pour l'imagerie nucléaire. Les vecteurs immunologiques radiomarqués sont depuis les années 90 proposés comme des médicaments radiopharmaceutiques. Plusieurs d'entre eux ont été commercialisés pour la TEMP. Cependant, la majorité a été retirée du marché pour une insuffisance de spécificité, des difficultés à la quantification et des réactions immunitaires liées à leur origine murine.

Les recherches sur les émetteurs de positons et l'arrivée des Ac issus du génie génétique ont permis un regain d'intérêt pour ces vecteurs. Les recherches dans ce domaine de l'imagerie nucléaire sont aujourd'hui nombreuses. Les principales applications cliniques sont la validation de nouvelles cibles, le diagnostic et la stadification des tumeurs, la sélection des patients pour une thérapie ciblée, l'évaluation dosimétrique avant une radioimmunothérapie et la réponse aux traitements anti-cancéreux.

### **II.B.2 Caractéristiques des cibles tumorales**

L'efficacité du ciblage de l'Ac dépend de 3 facteurs principaux : son affinité, sa spécificité antigénique et ses caractéristiques pharmacocinétiques (demi-vie sanguine, capacité à franchir les barrières tissulaires, métabolisation). Dans le cas d'un Ac radiomarqué, 2 autres facteurs sont également à considérer : l'ajout du radionucléide et les modifications de structure du vecteur nécessaires à sa fixation. Ces facteurs seront à l'origine de possibles variations des paramètres pharmacocinétiques de l'Ac comme l'illustre la figure. 10 ((36)) (36,37).



**Figure 10. Illustration de la variation de biodistribution d'un Ac due à la modification du vecteur (Andrew et al., 1988)**

Imagerie réalisée à 72h sur des souris nudes xéno greffées avec une lignée humaine de carcinome gastrique. Le traceur est un F(ab')<sub>2</sub> radiomarqué à l'<sup>131</sup>I (à gauche) ou à l'<sup>111</sup>In (à droite). Les flèches représentent le site tumoral.

### **II.B.2.a Nature de la tumeur**

L'accumulation spécifique de l'anticorps au sein de la tumeur est conditionnée par son transport. En effet, la distribution de l'Ac dans la tumeur est réalisée par son passage à travers l'endothélium vasculaire et par sa circulation à travers l'espace interstitiel avant d'atteindre les cellules tumorales. L'Ac est une macromolécule, sa diffusion à travers les tissus est donc très lente. En condition physiologique, son transport majoritaire est la convection qui dépend des différences de pressions vasculaire et interstitielle. En effet dans les tissus normaux, la pression interstitielle est inférieure à la pression vasculaire. Celle-ci est régulée par le réseau lymphatique qui draine les molécules à partir de l'espace interstitiel. Dans la tumeur, le réseau lymphatique n'est pas formé ou reste inefficace (38). Il en résulte une hypertension interstitielle qui nivelle ce gradient. Celle-ci est particulièrement importante au centre de la tumeur en raison des aberrations du système vasculaire tumoral.

Pour son développement, la tumeur au même titre que les tissus normaux, requiert l'apport de nutriments et d'oxygène. Elle doit également évacuer les déchets métaboliques et le dioxyde de carbone. Pour se faire, un switch angiogénique est obligatoire durant la progression tumorale (39). Il est réalisé par un déséquilibre de la balance d'activateurs et d'inhibiteurs de l'angiogénèse. L'hypersécrétion de facteurs de croissance comme le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) associé à une surexpression de ses récepteurs par la tumeur elle-même l'autonomise vis-à-vis de l'organisme et permettent la formation de

néovaisseaux. Les cellules endothéliales sont peu différenciées avec un niveau anormal de prolifération et d’apoptose. La structure de ces vaisseaux peut être similaire à celle des tissus sains avec des capillaires fenestrés, non fenestrés, discontinus, ou encore avec des shunts artério-veineux, mais également différente avec des vaisseaux sans revêtement endothélial ou des bourgeons capillaires. Le réseau produit est compliqué, fortement ramifié, avec des capillaires déformés, élargis et perméables. L’augmentation du volume tumoral s’accompagne d’un déséquilibre entre la vitesse de croissance tumorale et celle de son réseau. Les vaisseaux centraux de la tumeur sont rapidement écrasés du fait de la pression exercée par la densification cellulaire dans un espace confiné. Le réseau devient insuffisant pour irriguer toutes les zones tumorales. Il se crée alors une hétérogénéité de distribution des vaisseaux avec la formation de zones centrales semi-nécrotiques à nécrotiques (40). Dans ces régions, les vaisseaux subissent une pression sanguine plus importante qui impacte également la pression interstitielle adjacente (41).

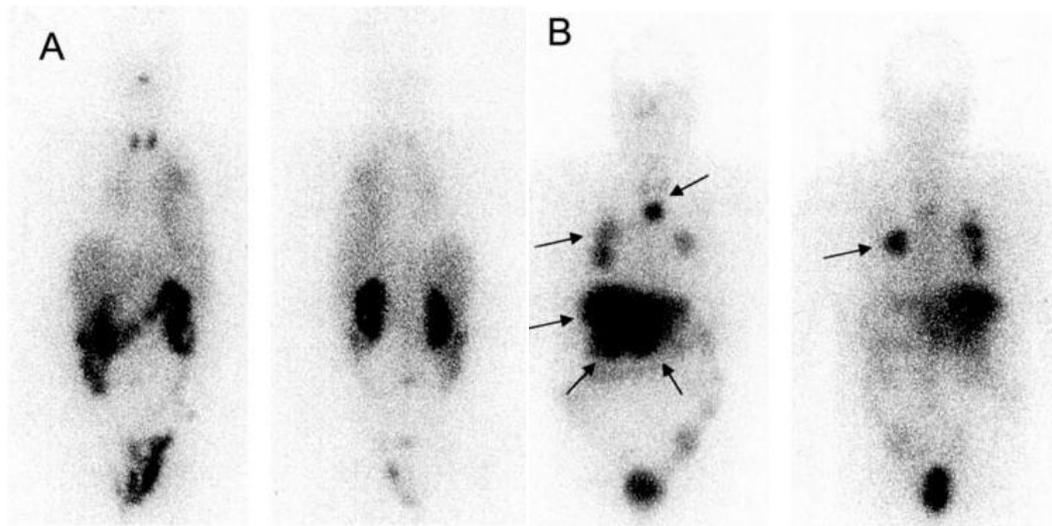
La diminution du nombre de vaisseaux dans ces régions entraîne une diminution de la surface d’échange entre le système sanguin et l’interstitium. Malgré une perméabilité plus importante des néovaisseaux, l’extravasation proportionnelle à la surface d’échange, diminue. Le transport transvasculaire va également être réduit par le gradient de pressions dans l’espace interstitiel. Au niveau périphérique qui est mieux irrigué, les macromolécules s’accumulent dans l’espace adjacent aux vaisseaux qu’ils viennent de traverser. Toutefois le gradient de pression limite leur diffusion dans l’interstitium et leur accès à la cible. Au centre de la tumeur, l’ensemble de conditions défavorables (manque d’irrigation, hyperpression interstitielle) rendent ces zones nécrotiques pratiquement inaccessibles pour l’Ac. Enfin, l’hétérogénéité de vascularisation entre les différentes tumeurs est également à prendre en compte. Le type de tumeur ainsi que sa taille entraîne un espace vasculaire pouvant aller de 1% à 20% (41). Plus cet espace est petit, plus la distance entre le vaisseau et la cible sera grande. Le parcours de l’anticorps s’allonge et augmente encore le temps de transport vers sa cible.

### **II.B.2.b Les antigènes tumoraux**

Les vecteurs immunologiques ont une structure basée sur celles des anticorps et reconnaissent une cible antigénique. L'antigène idéal doit être surexprimé par la tumeur et absent des tissus sains. Son expression à la surface des cellules tumorales doit être stable et il doit être accessible afin que la reconnaissance par l'anticorps soit la plus spécifique possible. De ce fait, il ne doit pas être sécrété dans le sang ou internalisé (42,43).

En réalité, l'expression des antigènes est très hétérogène entre les différentes zones tumorales. Cette hétérogénéité peut être liée soit à une expression transitoire selon la phase du développement tumoral soit à une hétérogénéité des types cellulaires présents au sein de la tumeur (44).

Pour l'Ac, la présence d'Ag au niveau périvasculaire est un frein à sa répartition au niveau de zones tumorales plus profondes. Cette idée est appelée « barrière du site de liaison ». Elle propose que l'un des principaux facteurs de variation de la distribution de l'Ac soit son affinité et son avidité pour l'Ag. Plusieurs modélisations ont été réalisées pour prédire le comportement de distribution de l'Ac en fonction de son affinité pour l'Ag (40,45). Elles montrent que plus l'Ac est affin pour sa cible, plus sa progression dans la tumeur est longue. *In vivo*, ce principe a été vérifié par la comparaison entre les distributions d'un Ac spécifique et d'un Ac aspécifique (46–48). Ils montrent qu'un Ac aspécifique se distribue de façon homogène dans la tumeur avec un déplacement sans contrainte. La dose accumulée reste très faible quelle que soit la dose injectée. *A contrario*, l'Ac spécifique est arrêté au niveau périvasculaire par la distribution des Ag dans cette zone. A faible dose, la quantité d'Ac présente dans la tumeur est faible mais celle-ci augmente avec un apport important d'Ac. L'injection d'une forte dose d'Ac semble donc supprimer cette barrière (fig. 11) (49).



**Figure 11. Comparaison de l’efficacité de ciblage en fonction de la dose d’Ac injectée (Kraeber-Bodéré et al., 2003)**

Images réalisées chez des patients ayant des tumeurs exprimant l’antigène carcino-embryonnaire. A. Images antérieure et postérieure pour l’injection de 10 mg / m<sup>2</sup> d’Ac bispécifique ciblant l’Ag et l’haptène suivi 2 jours après de l’injection de l’haptène radiomarqué à l’<sup>131</sup>I ; B. Images antérieure et postérieure pour l’injection de 50 mg / m<sup>2</sup> d’Ac bispécifique suivi 5 jours après de l’injection de la même dose d’haptène radiomarqué. Les flèches représentent les sites tumoraux

D’autre part, l’internalisation de l’Ag est également à prendre en compte. De nombreuses études ont été réalisées sur la relation entre la vitesse d’internalisation de l’Ag et l’affinité de l’Ac (50). Ces études, bien que difficiles à mener, mettent en évidence que si l’internalisation de l’Ag est rapide, l’Ac fixé sera également internalisé et catabolisé par la cellule. Pour l’immuno-TEP, le risque est l’augmentation de l’irradiation au niveau des organes d’excrétion essentiellement le foie et le rein qui captent ces métabolites. Inversement, dans le cas de la RIT, ce phénomène de captation et de rétention intra-cellulaire des métabolites radiomarqués peut être recherché pour accroître l’efficacité du traitement.

## II.B.3 Applications précliniques et cliniques

### II.B.3.a *Les anticorps entiers*

Les Ac entiers sont reconnus pour leur affinité, leur spécificité et leur stabilité. Cependant, ils possèdent également une demi-vie plasmatique longue qui peut être à l'origine d'une dosimétrie défavorable.

Avec ces vecteurs, les études en imagerie TEP concerne donc essentiellement des émetteurs de périodes longues comme le  $^{89}\text{Zr}$  et l' $^{124}\text{I}$ . La plupart des Ac radiomarqués sont déjà commercialisés en immunothérapie. L'objectif principal de ces études chez l'homme est l'évaluation non invasive de l'expression d'un marqueur tumoral et le suivi de la réponse au traitement par ces mêmes Ac. Il s'agit de compagnons de diagnostic pour la sélection des patients candidats à ces mêmes thérapies vectorisées.

L'un des plus évalués à l'heure actuelle est le trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>, Roche), Ac dirigé contre HER-2 (*Human Epidermal growth Factor receptor type 2*) et indiqué dans le cancer du sein précoce ou métastatique et le cancer gastrique exprimant HER-2. Dans une première étude menée sur 14 patientes atteintes d'un cancer du sein, l'Ac marqué au  $^{89}\text{Zr}$  montre une bonne efficacité de ciblage puisque pour 6 patientes l'ensemble des lésions connues (tumeur primaire ou métastases) ont été détectées. La détection de lésions inconnues a également pu être mise en évidence (51). De façon intéressante, les auteurs adaptent la dose injectée en fonction de l'historique de traitements des patientes (10mg pour les patientes ayant déjà reçu du trastuzumab et 50mg pour les naïves). En effet, il a été démontré que la présence de récepteurs FcRn (récepteur néonatal du Fc) aux niveaux endothélial et hépatique augmente le temps de circulation sanguine de l'Ac et peut être réduit par l'injection d'une haute dose d'Ac (52). Le délai nécessaire pour l'imagerie reste long puisqu'il est de 5 jours. De ce fait, l'impact dosimétrique de ce traceur est important (18 mSv). L'utilisation du  $^{64}\text{Cu}$  réduit le délai d'imagerie et donc la dosimétrie. En effet, deux études menées avec du  $^{64}\text{Cu}$ -trastuzumab montrent que le temps optimal pour l'obtention d'image est de 48 h (53,54). Cependant, les auteurs conviennent que le rapport signal/bruit de fond reste élevé comme précédemment avec le  $^{89}\text{Zr}$ . L'interprétation des images dans des organes très irrigués comme le foie ou le cœur est donc délicate. Cependant, la captation hépatique du traceur a pu être largement réduite par l'injection d'une dose de charge de 10 fois la dose en Ac non marqué sans que celle-ci n'altère la captation tumorale du traceur (54). Ceci confirme les

travaux de Dijkers et collaborateurs et confirme également que l’hétérogénéité d’expression de HER-2/Neu impacte la captation tumorale du traceur, mise en avant lors d’une autre étude chez la souris où le traceur était marqué à l’ $^{111}\text{In}$  (55).

Une autre étude datant de 2008 évalue l’intérêt du  $^{89}\text{Zr}$ -ibritumomab dans l’évaluation dosimétrique de cet Ac en RIT (56). Le Zévalin® (In-111 / Y-90-ibritumomab tiuxetan, Ac anti-CD20, Spectrum) est un anticorps murin indiqué dans le traitement des lymphomes non Hodgkiniens (9,57). Bien que le chélatant utilisé pour le radiomarquage du  $^{89}\text{Zr}$  soit différent de celui de l’ $^{90}\text{Y}$ , l’étude montre que la cinétique du  $^{89}\text{Zr}$ -ibritumomab est comparable à celle de l’ $^{90}\text{Y}$ -ibritumomab sauf au niveau hépatique où la captation est supérieure pour le  $^{89}\text{Zr}$ -ibritumomab. De ce fait, la dose absorbée au foie est supérieure pour celui-ci. De plus, la pré-injection du traceur n’altère pas la fixation tumorale du Zévalin® ce qui valide sa possible utilisation avant la RIT par Zévalin®. La différence majeure entre le traceur marqué au  $^{89}\text{Zr}$  et celui marqué à l’ $^{111}\text{In}$  est la captation dans la rate bien supérieure pour le deuxième. Celle-ci surestime la dose absorbée par cet organe, qui était l’organe limitant avec la moelle osseuse dans le traitement par l’ $^{90}\text{Y}$ -ibritumomab. L’ $^{89}\text{Zr}$ -ibritumomab apparaît donc comme un meilleur traceur pour l’évaluation dosimétrique du Zévalin®. Cependant, l’approvisionnement en  $^{89}\text{Zr}$  reste délicat et limite pour le moment la portée de cette étude. Une étude intéressante consisterait à évaluer la biodistribution de l’ibritumomab radiomarqué à l’ $^{86}\text{Y}$  qui est également un émetteur de positons et de la comparer à celle du  $^{89}\text{Zr}$ -ibritumomab. L’ $^{86}\text{Y}$  est à l’heure actuelle encore peu utilisé car sa désintégration s’accompagne de l’émission de nombreux photons  $\gamma$  de haute énergie qui interfèrent dans la quantification lors de l’acquisition par TEP et posent des problèmes importants de radioprotection. Cependant les recherches sur la correction des anomalies liées à ces émissions sont en cours et devraient permettre d’obtenir à terme une imagerie des médicaments radiomarqués à l’ $^{90}\text{Y}$ .

D’autres Ac commercialisés sont également à l’étude comme le bevacizumab (anti-VEGF, Avastin®, Roche), le cetuximab (anti-EGFR, Erbitux®, Merck) et le panitumumab (anti-EGFR, Vectibix, Amgen) (58–63). Les essais précliniques avec ces Ac donnent des résultats intéressants qui pourraient amener également ces traceurs en clinique.

L’autre objectif des recherches avec des Ac marqués est la validation de nouveaux biomarqueurs. Ces études sont réalisées avec des Ac développés par des techniques de

génie génétique et contrairement aux études de suivi de traitement, elles utilisent pour la plupart des Ac qui sont encore en études cliniques à l’heure actuelle.

Récemment, les résultats de l’essai multicentrique de phase III REDECT (REnal Masses: Pivotal Study to DETECT Clear Cell Renal Cell Carcinoma With Pre-Surgical PET/CT) sur le carcinome rénal à cellules claires avec le Girentuximab marqué à l’<sup>124</sup>I ont été publiés (64). Cet essai concerne le cG250, Ac chimérique reconnaissant l’anhydrase carbonique IX, antigène présent de façon homogène et spécifique à la surface des cellules de ce type de cancer très agressif (65). L’étude confirme la bonne spécificité du traceur à 86.2%, correspondant au fait que le traceur ne se fixe pas si les cellules ne sont pas cancéreuses, et à la bonne sélectivité de celui-ci pour l’Ag à 85.9%. Les résultats obtenus en TEP pour ces deux paramètres statistiques sont supérieurs à ceux obtenus avec le scanner multimodal seul (47% et 76% respectivement). De plus, l’étude met en avant l’intérêt du Girentuximab dans le diagnostic des patients après découverte d’une masse rénale suspecte, l’aide à la décision pour la chirurgie et le suivi du traitement. Une étude préclinique avec cet Ac a été proposée pour comparer les marquages à l’<sup>124</sup>I et au <sup>89</sup>Zr. La cinétique d’excrétion plus lente <sup>89</sup>Zr-Girentuximab par rapport au traceur iodé le rend plus intéressant pour l’imagerie. De plus, la stabilité du marquage est également en faveur du <sup>89</sup>Zr (66,67).

Un autre Ac en étude clinique radiomarqué à l’<sup>124</sup>I, est le huA33, anticorps humanisé reconnaissant l’Ag A33, glycoprotéine transmembranaire exprimée à plus de 95% dans les adénocarcinomes du colon et 50% dans le carcinome pancréatique (68). Sur les 25 patients évalués, 10 des 12 tumeurs primitives et la totalité des métastases hépatiques ont pu être détectées. Le rapport tumeur / tissu sain est de 3.9 pour le colon et 9.3 pour le foie. Dans cette étude de faisabilité en imagerie du huA33, la demi-vie biologique dans la tumeur de l’Ac n’a pas pu être évaluée par les auteurs car très variable d’un individu à l’autre ( $T_{1/2} = 336 \pm 258h$ ).

La région v6 du CD44 est un Ag exprimé par 96% des carcinomes à cellules squameuses de la tête et du cou (CCSTC) de façon homogène. Cette cible est à l’étude depuis plus de 20 ans grâce à la production d’un Ac chimérique, l’Ac U36 qui la reconnaît de façon spécifique (69). Aujourd’hui en phase clinique, cet Ac fait l’objet d’une évaluation comme traceur en immuno-TEP. Börjesson et collaborateurs ont ainsi étudié son marquage au <sup>89</sup>Zr et sa dosimétrie chez des patients atteints de CCSTC (70,71). Ils démontrent la capacité de l’U36 à

être un traceur intéressant dans la recherche des tumeurs primitives et des métastases locaux-régionales. Sa sensibilité (correspondant à l'obtention d'un résultat positif du test statistique quand l'hypothèse est vérifiée) et sa spécificité sont similaires à celles obtenues pour un diagnostic par imagerie par résonance magnétique (IRM). La dosimétrie reste cependant élevée car comme précédemment avec les études sur le  $^{89}\text{Zr}$ -trastuzumab, la clairance sanguine du traceur est très longue. Une dose moyenne par patient est de 40mSv. Les auteurs proposent l'utilisation de caméras plus récentes permettant de limiter la dose injectée aux patients. La présence de l'Ag CD44v6 dans la thyroïde a motivée l'exploration de cet Ag comme cible dans les carcinomes thyroïdiens anaplasiques (72). Dans cette étude *in vitro*, les auteurs démontrent la spécificité de  $^{124}\text{I}$ -U36 à cibler l'Ag. L'intérêt de l'U36 dans ce type de carcinomes restent cependant à démontrer *in vivo*.

L'endosialine / CD 248 / *tumor endothelial marker 1* (TEM1) est également à l'étude comme marqueurs de la vascularisation tumorale (73). Il est exprimé dans de multiples cancers et a été validé comme un Ag spécifique de la malignité cellulaire (74). Plusieurs essais cliniques sont en cours avec l'Ac humanisé MORAb-004 qui cible l'endosialine en immunothérapie, seul ou en association avec des chimiothérapies. Pour confirmer de façon non invasive la surexpression de l'Ag par les tumeurs, l'équipe de Charko a proposé un marquage à  $^{124}\text{I}$  de l'Ac MORAb-004. Ils montrent que l'Ac est spécifique de l'endosialine humaine et que la cinétique de captation tumorale est rapide et stable (4h à 6 jours).

Comme précédemment, l'utilisation en essai clinique du TRC105, nouvel Ac chimérique anti-angiogénique ciblant l'endogline / CD105 a favorisé son étude en imagerie nucléaire. De façon originale, l'étude porte sur un traceur d'imagerie à double modalité puisque le TRC105 est à la fois marqué avec un fluorochrome et le  $^{64}\text{Cu}$ . Le but de ce double marquage est l'aide à la chirurgie puisqu'après une confirmation du ciblage par imagerie TEP, le chirurgien peut visualiser simplement les masses par fluorescence dans le proche infra-rouge. Le TRC105 a également été marqué avec un radionucléide exotique, le  $^{66}\text{Ga}$  dont la faible émission  $\beta +$  et la haute activité dosimétrique ne sont pas favorables à sa future utilisation en clinique (75).

Les Ac sont donc des vecteurs intéressants pour l'imagerie TEP. Leur utilisation reste cependant très limitée. Les études portent essentiellement sur l'apport de l'imagerie dans le suivi des patients bénéficiant d'une immunothérapie ou dans la validation du ciblage d'Ac en essais cliniques. En France, la promotion d'essais cliniques portant sur les Ac

radiomarqués est inexistante. En effet, les quelques études qui ont été proposées ne portent que sur un faible taux d’inclusions. Ce phénomène s’explique par le statut de ces médicaments expérimentaux qui est celui de préparation magistrale et non de médicaments pour essais cliniques. De ce fait, la quantité d’unités produites est très limitée, entraînant un intérêt réduit pour ce type d’études. La flexibilité réglementaire et l’augmentation des moyens alloués devraient permettre aux équipes de recherche françaises travaillant sur ce domaine d’obtenir une meilleure visibilité internationale.

### **II.B.3.b *Les fragments d’anticorps***

Comme traceurs diagnostiques, les fragments d’anticorps issus de la digestion enzymatique des Ac sont des vecteurs favorables par leur clairance plus rapide et leur taille réduite. Cependant, l’obtention de ces fragments est délicate car elle n’est pas facilement transposable au niveau industriel. De plus, ils sont rapidement métabolisés par les protéases sanguines ou hépatiques (76). Ces fragments ont été étudiés dans les années 80 et 90. Aujourd’hui, les vecteurs issus du génie génétique, de tailles similaires et décrits dans la suite de ce chapitre, sont largement préférés. Peu d’études en TEP sont donc réalisées avec ces fragments. Une première étude clinique utilisant le fragment F(ab’)<sub>2</sub> du trastuzumab a été proposée en 2013 (77). Le F(ab’)<sub>2</sub> était marqué avec le <sup>68</sup>Ga. Les résultats sont cependant décevants puisque le traceur ne permet pas de visualiser les lésions détectées par le <sup>18</sup>F-FDG. Les auteurs l’expliquent notamment par l’hétérogénéité du groupe patient, dans lequel environ la moitié des patientes sont naïves à l’immunothérapie par trastuzumab alors que l’autre moitié a déjà été traitée par cet Ac. Pour celles-ci, une compétition entre l’Ac circulant et le traceur pourrait être la cause des résultats mitigés de l’étude. Il est également important de souligner que l’immunoréactivité du F(ab’)<sub>2</sub> est faible à 51.3%.

En 2014, l’équipe de Ma a proposé une évaluation de l’efficacité du traitement par trastuzumab grâce à l’EGFR co-exprimé par les cellules HER-2 positives (78). En effet, une régulation négative de l’expression de l’EGFR a été démontrée lors du traitement par l’Herceptin<sup>®</sup> (79). Pour cette étude préclinique, un fragment F(ab’)<sub>2</sub> du panitumumab est marqué au <sup>68</sup>Ga. L’imagerie réalisée 3h après l’injection montre une captation tumorale modeste d’environ 2% de la dose injectée / g de tumeur. Malheureusement, l’intérêt de cette étude ne réside pas dans l’utilisation de ce F(ab’)<sub>2</sub> comme nouveau traceur mais dans

la faisabilité d’utiliser l’EGFR comme marqueur de l’efficacité de traitement au trastuzumab. De ce fait, la cinétique du traceur et son comportement *in vivo* ne sont pas explorés.

Un traceur utilisant le fragment  $^{64}\text{Cu-F(ab')}_2$  du TRC105 et ciblant l’endogline a été étudié. Celui-ci est comparé au TRC105 également marqué au  $^{64}\text{Cu}$  (80). Les résultats de l’étude sont en faveur du  $\text{F(ab')}_2$ . La cinétique de captation est rapide avec un maximum à 3h. La quantité de traceur présent au niveau tumoral reste cependant moins importante que pour l’Ac. Ceci s’explique notamment par la clairance plus rapide du  $\text{F(ab')}_2$ . Les auteurs proposent également un marquage avec le  $^{61}\text{Cu}$ , émetteur de position d’une demi-vie plus courte que le  $^{64}\text{Cu}$  (3,3h contre 12,7h) et possédant un pourcentage d’émission  $\beta^+$  plus élevé (60% contre 17%). Les études menées avec ce traceur ne montrent pas de différences de distribution. L’intérêt du  $^{61}\text{Cu}$  devra être évalué par une étude de dosimétrie.

Les fragments d’Ac ne sont pas considérés comme des traceurs d’avenir mais ils sont utilisés comme prototype pour le futur développement de traceurs issus du génie génétique. Ainsi les études précliniques avec ces traceurs resteront des analyses de faisabilité pour confirmer la spécificité de la reconnaissance pour la cible et le choix de la taille. Aujourd’hui, les stratégies de production se tournent vers des vecteurs produits de façon expansive sans l’obligation d’un traitement post-purification.

## **III Optimisation de l'immuno-TEP**

L'immuno-TEP ne fait pas uniquement référence aux vecteurs issus de dérivés d'Ac humains. En effet, des peptides (affibodies) ou des Ac non humains (nanobodies) sont également à l'étude en imagerie TEP. Leurs propriétés pharmacocinétiques sont compatibles avec ces applications. Cependant ce projet concerne des vecteurs issus d'Ac humains. Ce chapitre présente donc les avancées et les optimisations réalisées pour ce type de vecteurs.

### **III.A La taille du vecteur**

#### **III.A.1 Les scFv**

Les études sur les Ac ont montré que la taille des vecteurs entraînait une cinétique sanguine lente qui limitait leur utilisation en clinique. La première réponse à ce problème fut la création de vecteurs de taille réduite issus du génie génétique et appelés les scFv (pour *single chain variable fragment*).

Les scFv sont constitués de domaines  $V_H$  et  $V_L$  joints par un peptide de liaison de 15 à 25aa. Ils sont synthétisés par expression bactérienne et donc relativement simples à produire (81,82). La taille du vecteur est d'environ six fois inférieure à celle d'un Ac soit environ 27kDa. Elle induit donc une clairance sanguine extrêmement rapide de 30min à 2h. Le scFv possède les caractéristiques d'affinité et de spécificité de liaison de l'Ac père mais son avidité est fortement diminuée par la présence d'un seul paratope. De plus, sa stabilité et son affinité pour l'Ag apparaissent dépendantes de l'orientation des domaines variables lors de sa synthèse. Une abolition complète de son activité a été observée lors de changements d'accrochage des domaines  $V_H$  et  $V_L$  par le peptide de liaison (83).

Pour augmenter le temps de circulation du vecteur, l'ajout de polyéthylène glycol (PEG) de différentes tailles a été proposé (84). Une corrélation entre l'augmentation de la demi-vie du vecteur et la taille de la molécule a pu être mise en évidence. Cependant une diminution importante de l'association du vecteur avec l'Ag est observée en résonance plasmonique de surface.

La fusion avec l'albumine a également été proposée pour améliorer la demi-vie du vecteur (85). Une augmentation importante du temps de rétention du vecteur dans la tumeur a été mise en évidence au cours de cette étude. La taille du vecteur de 90kDa

### **L'optimisation de l'immuno-TEP – Taille du vecteur – Les ScFv multivalents**

augmente également le temps de captation tumorale. Le maximum de captation est de 18h, ce qui pourrait être un facteur limitant à son utilisation en clinique.

Ce vecteur a fait l'objet de nombreuses études de marquage notamment au  $^{99m}\text{Tc}$  (86,87), à  $^{111}\text{In}$  (88) ou encore au  $^{177}\text{Lu}$  (89). Cependant sa cinétique extrêmement rapide et sa faible captation tumorale ne permettent pas son utilisation en imagerie ou en RIT.

### **III.A.2 Les scFv multivalents**

L'une des limites des scFv est leur faible avidité en comparaison de l'Ac père du fait de leur monovalence. De nombreuses équipes ont travaillé sur l'association de scFv.

Une première approche est la diminution du peptide de liaison entre les domaines variables (< 10aa). Cette réduction oblige le déploiement de la molécule qui va spontanément se lier à un autre scFv. Cette structure est appelée diabody. Sa taille de 50kDa augmente le temps de clairance tout en augmentant de façon importante la captation tumorale du vecteur (90). Différents diabodies ciblant l'antigène des cellules souches de la prostate (PSCA), le récepteur HER2, l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) ou encore le CD-20 ont été marqués. Ces diabodies ont été marqués à l' $^{124}\text{I}$  (91–94). Leurs cinétiques sont relativement similaires avec une demi-vie de 3h à 7h, ce qui permet une augmentation de leur captation tumorale en comparaison avec le scFv. Cependant un risque d'une diminution de leur immunoréactivité est possible, due aux faibles nombres de sites disponibles pour la conjugaison d'un chélatant et le radiomarquage. L'ajout d'une cystéine terminale est une des solutions proposées pour obtenir un site de conjugaison plus spécifique (95,96). Cependant, la structure même du vecteur ayant été modifiée, une réévaluation de sa biodistribution doit être envisagée.

Du fait de leur rapide cinétique de captation, les diabodies ont été marqués avec d'autres radionucléides de demi-vies plus courtes notamment le  $^{18}\text{F}$  ou le  $^{68}\text{Ga}$  (97–99). Très récemment une étude portant sur un nouveau diabody ciblant le PSMA (*prostate specific membran antigen*) marqué au  $^{89}\text{Zr}$  montre une nette amélioration de la captation tumorale à 24h en comparaison de son Ac père. De plus, l'internalisation du PSMA limite son ciblage par un Ac complet ce qui est également favorable au diabody (100).

### **L'optimisation de l'immuno-TEP – Taille du vecteur – Les minibodies**

Le diabody n'est pas le seul vecteur à avoir été proposé. La production de scFv divalent par génie génétique permet la tétramérisation spontanée des vecteurs qui restent stables *in vivo* (101). L'ajout d'un agent chimique comme le bismaléimide associe 2 scFv par liaison covalente grâce à des cystéines en C-ter (102). Enfin, des domaines de multimérisation ont été fusionnés aux scFv notamment le domaine de tétramérisation de p53 ou des leucines zippers (103,104).

La recherche sur les scFv multivalents est toujours en cours à l'heure actuelle. La nette augmentation de leur captation tumorale est cependant contrebalancée par la difficulté des techniques de productions de ces vecteurs et l'augmentation de leur temps de demi-vie proportionnelle à leur taille (105). Malgré ces problèmes, les diabodies restent les plus étudiés pour l'imagerie nucléaire.

### **III.A.3 Les minibodies**

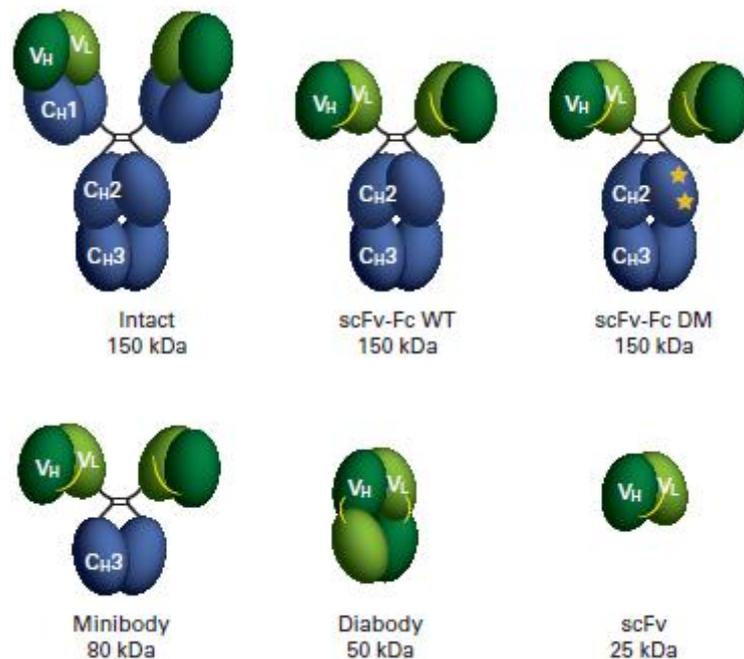
Pour limiter l'accumulation rénale du diabody, des vecteurs possédant un domaine CH<sub>3</sub> ont été synthétisés. Ces minibodies dont la taille est d'environ 80kDa ne sont pas excrétés par le rein (filtration < 60kDa). Deux formes ont été présentées : l'une est caractérisée par la liaison non covalente des parties scFv-CH<sub>3</sub> grâce à 2 résidus d'aa (LD-minibody), l'autre par l'intermédiaire d'une région charnière d'une IgG<sub>1</sub> associée par ses fonctions thiols à un peptide flexible de 10aa (FLEX minibody). Ces deux vecteurs ciblaient le ACE (106). Dans cette étude, les vecteurs ont été marqué avec de l'<sup>90</sup>Y pour la thérapie et de l'<sup>123</sup>I pour l'imagerie. Les études montrent que Le FLEX minibody est supérieur au LD-minibody comme vecteur. Les auteurs expliquent ce résultat par la distance séparant les deux scFv qui est plus grande pour le LD minibody et par la meilleure accessibilité des domaines variables du FLEX minibody. A 19h post-injection (pi), la faible concentration en vecteur circulant est encore suffisante pour l'imagerie TEMP. La cinétique sanguine du FLEX minibody et sa forte captation tumorale à 48h le prédispose pour une utilisation en thérapie. D'autres études confirment cette observation. Toujours dirigé contre le ACE, ce vecteur a été marqué au <sup>64</sup>Cu (107) et à l'<sup>124</sup>I (93). Une augmentation de la captation hépatique du vecteur et une forte diminution de sa rétention rénale confirment le postulat sur la taille du vecteur. D'autres minibodies ciblant le récepteur HER-2, l'antigène PSCA ou encore le CD8 montrent des

**L'optimisation de l'immuno-TEP – Taille du vecteur – Les minibodies**

pharmacocinétiques similaires à celle du FLEX-minibody (108–110). Un minibody issu du rituximab (anti-CD20) a également été proposé. Il diffère des autres par la fusion d'une région charnière complète d'IgG<sub>4</sub> lié à un peptide de liaison de 18aa. Cette modification ne change pas réellement sa cinétique puisque le maximum de captation tumorale est déterminé à 21h pi (111). De façon identique, deux autres vecteurs d'une taille similaire aux minibodies nommés *small immunoproteins* (SIP) et miniantibody ont été évalués en TEP. Le premier est la fusion de scFv avec le domaine CH<sub>4</sub> de la forme sécrétée d'une IgE<sub>2</sub>, l'ensemble étant stabilisé par des ponts disulfures. La cinétique de ce vecteur marqué à l'<sup>124</sup>I donne des images optimales à 72h pi (112). Suite à ces résultats encourageants, quatre essais cliniques en RIT ont été initiés et sont actuellement en cours (113,114). Récemment l'équipe a rapporté que l'étude dosimétrique de ce traceur, marqué à l'<sup>124</sup>I pour l'imagerie TEP, est prédictif de sa dosimétrie avec de l'<sup>131</sup>I (115). Le deuxième vecteur est une association d'un domaine CH<sub>4</sub> d'une IgE et de la région charnière d'une IgG1 modifié sur le domaine CH<sub>2</sub>. Ce vecteur marqué par l'<sup>86</sup>Y donne des résultats d'imagerie TEP intéressants à 72h pi. Pour les auteurs, en comparaison du diabody marqué à l'<sup>111</sup>In, le niveau de captation tumorale reste cependant insuffisant pour le diagnostic (116).

La présence d'un domaine CH<sub>3</sub> n'entraîne pas une reconnaissance de la partie Fc des IgG par les récepteurs au domaine Fc. Ceci explique notamment la différence notable de cinétique obtenue avec des vecteurs fusionnés avec des domaines Fc d'IgG<sub>4</sub> complets, dont le temps de demi-vie de 12j s'approche de celui des IgG<sub>4</sub> (117). Des essais de mutation au niveau des domaines CH<sub>2</sub> rendent le comportement de ces vecteurs similaire à celui des minibodies, confirmant l'impact du récepteur au Fc sur l'allongement de la durée de circulation des vecteurs dans le sang (118).

**L'optimisation de l'immuno-TEP – Taille du vecteur – Les minibodies**



**Figure 12. Représentation des différents vecteurs en immuno-TEP**

Bien que pour l'immuno-TEP le choix de la taille du vecteur soit essentiel (fig. 12), il est intéressant selon la finalité de cette imagerie de s'intéresser à d'autres facteurs. La cible antigénique ainsi que la radiochimie employée pour le marquage du vecteur auront également un impact sur le ciblage de la tumeur, la stabilité de celui-ci et la sensibilité de l'imagerie.

### **III.B La cible antigénique**

Le choix de la cible repose sur la connaissance de l'antigène. L'exploration de marqueurs associés à une fonction biologique comme l'inhibition de la prolifération tumorale ou l'induction de l'apoptose sont une nouvelle voie d'approche. Il s'agit de récepteurs, d'enzymes ou de protéines transductrices du signal ayant un rôle dans le développement tumoral (119,120). Dans ce cas, l'Ac n'a plus uniquement une fonction de vecteur. Son action intrinsèque sur la cellule devra également être étudiée pour limiter le risque d'effets indésirables.

L'Ag possède des caractères d'expression et de localisation qui lui sont propres. Comme nous l'avons vu précédemment, il est important de prendre en compte le renouvellement

### **L'optimisation de l'immuno-TEP – La cible antigénique – L'ACE**

extra-membranaire de l'Ag et sa vitesse de recyclage. D'autre part, le type de tumeur exprimant ces Ag, solide ou hématologique doit être considéré.

Pour notre étude, nous avons décidé de cibler 2 Ag représentant les 2 grands types de tumeurs : l'ACE (antigène carcino-embryonnaire) et l'Ag CD22. Ce choix est lié à la diversité qu'ils représentent et à la littérature pré-existante à leur sujet.

#### **III.B.1 L'antigène carcino-embryonnaire**

L'ACE est un membre du groupe des molécules d'adhésion (CEACAM), une subdivision de la superfamille des immunoglobulines (Ig) de molécules d'adhésion cellulaire (IgCAMs). Les IgCAMs constituent un groupe de glycoprotéines de surface dont le rôle majoritaire est l'adhésion entre cellules.

L'ACE est codé par le gène CEACAM5. Sa structure est de 7 domaines extracellulaires d'Ig et d'un ancrage glycosylphosphatidylinositol (121). Il s'agit d'un monomère d'environ 150 kDa. L'ACE est faiblement exprimé de façon physiologique chez l'homme. Il est présent sur la face apicale des cellules épithéliales dans le colon, la muqueuse nasale, la muqueuse pylorique, l'œsophage, les glandes sudoripares et la prostate. Il est sécrété de façon très faible dans le sang. Son expression est fortement augmentée dans de nombreux cancers d'origine épithéliale : carcinome colo-rectal, carcinome gastrique, carcinome pancréatique, carcinome du sein, carcinomes du tractus uro-génital mais également dans le carcinome du poumon à petites cellules ainsi que dans le carcinome médullaire de la thyroïde. Son rôle dans l'adhésion intercellulaire serait essentiellement réalisé par le domaine IgV-like N terminal et inclurait les deux feuillets  $\beta$  (122). De ce fait, il serait impliqué dans l'inhibition de la différenciation cellulaire, de l'apoptose des cellules adhérentes ou l'envahissement métastatique (123,124).

Son identification dans le cancer colorectal au milieu des années 60 par Gold et Freedman (125,126) a eu un impact important dans l'immunologie du cancer, son diagnostic, sa détection, son suivi et sa thérapie. En effet, à partir du milieu des années 70, plusieurs équipes de recherche ont proposé son ciblage pour la RIT (127–130).

### **III.B.2 L'antigène CD-22**

L'antigène CD-22 est un représentant de la famille des siglec (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins) ou lectines de type 1 d'environ 140 kDa. Les lectines de type 1 appartiennent à la super-famille des immunoglobulines et reconnaissent spécifiquement l'acide sialique. Elles sont la cible de nombreux pathogènes qui se servent de leur affinité pour ce sucre pour infecter la cellule hôte. Les lectines sont des protéines transmembranaires largement exprimées par les cellules du système immunitaire (131). Une même cellule peut exprimer à sa surface différentes lectines comme c'est le cas pour le lymphocyte B qui en exprime 2 dont le CD-22. Cette molécule est l'un des nombreux co-récepteurs du récepteur des cellules B (BCR, *B cells receptor*). Son rôle principal est la modulation négative de l'activation du lymphocyte B lors de la liaison d'un antigène avec le BCR. Cette liaison réalisée en *cis* et à proximité du BCR entraîne la phosphorylation des tyrosines présentes sur la partie intra-cytoplasmique du CD-22 aboutissant à l'inhibition de l'activation du lymphocyte B (132). La liaison en *trans* entraîne également une phosphorylation de ses tyrosines. Cependant, la configuration *trans* n'est possible qu'avec peu de molécules exprimées essentiellement par l'endothélium sinusoidal de la moelle osseuse. Dans ce cas, l'activation du CD-22 permet le déplacement du lymphocyte B dans la moelle osseuse et sa recirculation dans l'organisme. Cet antigène possède également un rôle dans la maturation des lymphocytes B notamment les lymphocytes B folliculaires. Le CD-22 est exprimé par les cellules à tous les stades de développement du lymphocyte B dès le stade pré-B (133). Il est également exprimé sur les lymphocytes activés et les lymphocytes mémoires. Seules les cellules circulantes, à un stade ultime de différenciation, perdent son expression. Cette propriété rend le CD-22 attractif comme cible pour les thérapies anti-lymphocytes B. Des applications ont été développées dans le traitement de certains lymphomes à cellules B (134–136), certaines leucémies aiguës et dans le traitement du lupus érythémateux systémique (137).

### **III.C Le radiomarquage**

La radiochimie impacte la distribution du traceur *in vivo*. Les radionucléides peuvent être conjugués au vecteur soit de façon directe soit de manière indirecte par l'ajout d'un complexant ou d'un intermédiaire de synthèse comme le synthon.

Le marquage direct le plus couramment cité est celui de l'iode. Il est réalisé par une substitution électrophile sur un résidu tyrosine en conditions oxydantes. Cependant, ce type de marquage n'est pas spécifique à une position de l'Ac et peut entraîner une diminution voir une abolition de l'activité de l'Ac essentiellement si des tyrosines sont présentes au niveau des CDR. D'autre part, l'iodination directe n'est pas favorable si l'Ac est rapidement internalisé par la cellule. En effet, le catabolisme de l'Ac entraîne sa désiodination. L'iode est rapidement rejeté de la cellule et se retrouvera capté par la thyroïde avec une diminution du signal au niveau de la tumeur.

Le marquage indirect emploie majoritairement des chélatants. Ils sont indispensables à l'association de radiométaux sur des vecteurs. Ces chélatants sont conjugués généralement par des groupements  $\epsilon$ -amino des lysines ou dans les groupements N-ter des protéines. Ces liaisons sont pour la plupart très stables *in vivo*. Le catabolisme intra-cellulaire de l'Ac n'entraîne pas l'expulsion du radionucléide qui reste dans la cellule et augmente encore le rapport signal / bruit de fond. La limite majeure à leur utilisation est la captation rénale et hépatique des vecteurs qui de la même manière augmente la dosimétrie de ces organes. L'étude de ce facteur est donc indispensable dans la validation du traceur. Comme pour le marquage direct, la conjugaison aléatoire des chélatants sur l'Ac peut diminuer l'activité des Ac. Des méthodes de fixation dirigée contre les cystéines présentes dans la région charnière des Ac permettent après réduction de l'Ac de limiter ce phénomène. Dans ce cas, l'Ac devient un fragment de plus petite taille et perd ses caractéristiques de biodistribution.

La métabolisation intra-cellulaire des Ac est un frein réel à leur utilisation en clinique. Elle implique une accumulation importante des radionucléides dans les organes d'excrétion. Des stratégies ont été proposées pour réduire la dosimétrie rénale ou hépatique. La plus simple, et déjà décrite précédemment, est de diminuer la liaison aspécifique du vecteur par un apport important de produit froid. Le large excès de vecteur froid bloque les RFcn et réduit la captation hépatique du traceur. De même, cette saturation a pour effet d'améliorer la captation tumorale. L'accumulation rénale des métabolites radiomarqués ou des petits

### **L'optimisation de l'immuno-TEP – Les systèmes de préciblage**

traceurs peut être bloquée par des mélanges polyaminés. Ilsaturent les systèmes de recapture anionique ou cationique. Cette solution a déjà été largement validée en clinique.

L'optimisation par le radiomarquage n'est pas la seule possibilité pour limiter la dosimétrie et améliorer la sensibilité de l'imagerie. Des équipes ont travaillé sur des systèmes multi-temps où l'apport d'une molécule de cinétique rapide va réduire le temps de résidence du radionucléide dans les organes sains sans altérer la rétention au niveau tumorale. Il s'agit des systèmes de préciblage.

### **III.D Les systèmes de préciblage**

Les systèmes de préciblage sont des axes de recherche préclinique et clinique débutés dans les années 80 et toujours très actifs à l'heure actuelle. Le principe repose sur le préciblage de la tumeur par un vecteur immunologique de taille importante comme un anticorps ou un  $F(ab')_2$  non marqué. Ce vecteur est fonctionnalisé de telle sorte qu'il puisse reconnaître également une petite molécule. Puis, la petite molécule radiomarquée, ayant une cinétique de distribution et d'élimination rapide mais possédant une forte affinité pour le vecteur immunologique, va être à son tour injectée. Elle se liera au vecteur pré-localisé sur la tumeur formant un construct suffisamment stable pour permettre la détection ou avoir un effet thérapeutique.

En imagerie, le préciblage améliore le rapport signal / bruit de fond et rend la cinétique de captation tumorale extrêmement rapide. Il est important de noter que tous ces systèmes ont été développés au départ pour la RIT. L'utilisation diagnostique n'a été proposée que depuis 5 ans. Leur intérêt majeur réside dans la diminution de la dosimétrie notamment pour la moelle osseuse. Ce chapitre prendra donc ces exemples autant dans la RIT que dans l'imagerie puisque le développement de ces techniques se fait en parallèle, dans l'objectif du principe de théranostic évoqué en introduction de ce mémoire.

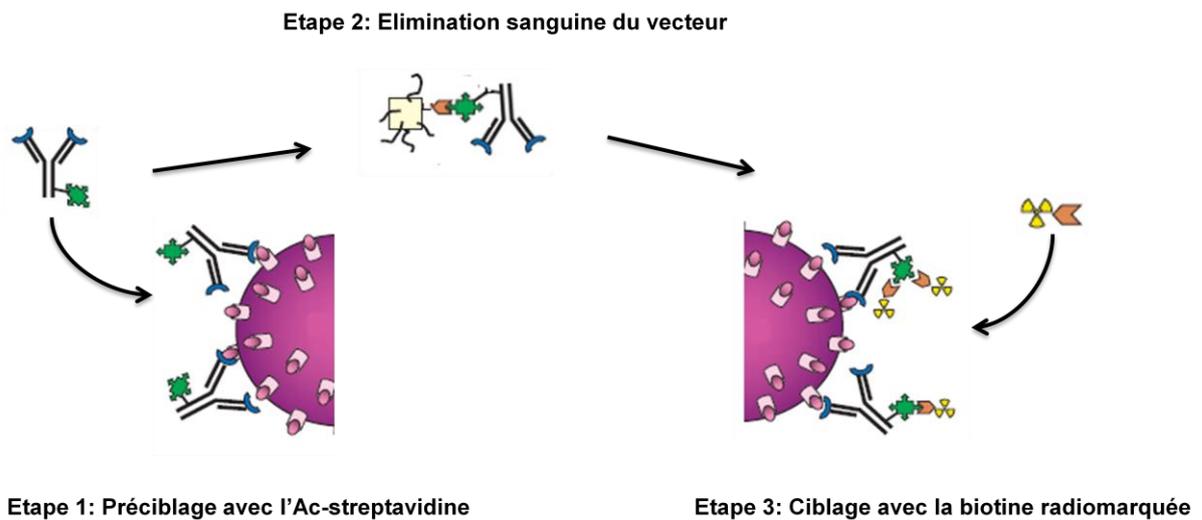
Six systèmes sont à l'étude : les 2 systèmes avidine/streptavidine-biotine, le système anticorps bispécifique (AcBs)-haptène, les systèmes de chimie bioorthogonale, le système de nucléotides complémentaires et le système enzyme-prodrogue. Les 2 dernières stratégies, n'ayant à l'heure actuelle aucun développement en imagerie TEP, ne seront pas abordées dans ce chapitre.

### **III.D.1 Principes des systèmes de préciblage**

#### **III.D.1.a Le système streptavidine-biotine**

L'avidine, protéine de 66kDa découverte dans le blanc d'œuf, ou la streptavidine produite par *Streptomyces avidinii*, possèdent une très forte affinité pour la biotine (vitamine B8). Leur  $K_a$ , de l'ordre de  $10^{-15}$ M, est environ 1 000 000 fois supérieur à celui d'un anticorps pour un antigène. L'équipe de Hnatowich a donc proposé ce complexe pour l'imagerie et la RIT (138). Deux stratégies ont été étudiées. La première est le préciblage de la tumeur par un Ac conjugué à la streptavidine. Cette dernière a été préférée à l'avidine car sa faible glycosylation devait entraîner une plus faible réaction immunitaire lors de son injection chez l'homme ou l'animal (fig. 13). Après fixation du vecteur à sa cible et selon le temps de clairance sanguine du vecteur, une biotine marquée est injectée. Sa petite taille (244 Da) lui permet d'être rapidement distribuée au niveau de la tumeur et sa forte affinité pour la streptavidine rend sa liaison au vecteur stable dans le temps. Elle est également faiblement présente dans le sang chez l'homme ce qui limite les interactions avec le vecteur. Cependant, la très lente clairance du vecteur Ac-streptavidine (220 kDa) nécessite une 3<sup>ème</sup> étape : l'injection d'un agent de chasse qui va accélérer son excrétion. Ce système en 3 étapes est donc plus contraignant. L'étape de chasse ne permet pas d'éliminer complètement le vecteur et des complexes radiomarqués se retrouvent dans la circulation sanguine. De plus, la biotine est la cible de biotinidases qui dégradent la molécule et diminuent le taux de captation à la tumeur (139). Enfin, des réactions immunitaires de type humoral ont été décrites lors des premiers essais chez l'homme. Ces réactions étaient liées à l'immunogénicité de la streptavidine (140). Bien que transitoires, elles limitent les applications cliniques de la streptavidine. L'étude du remplacement de la streptavidine par l'avidine réalisée en parallèle à cet essai montre qu'au final, l'immunoréactivité de l'avidine est plus faible que celle de la streptavidine mais reste élevée, surtout dans le groupe de patients ayant reçu plusieurs injections (141).

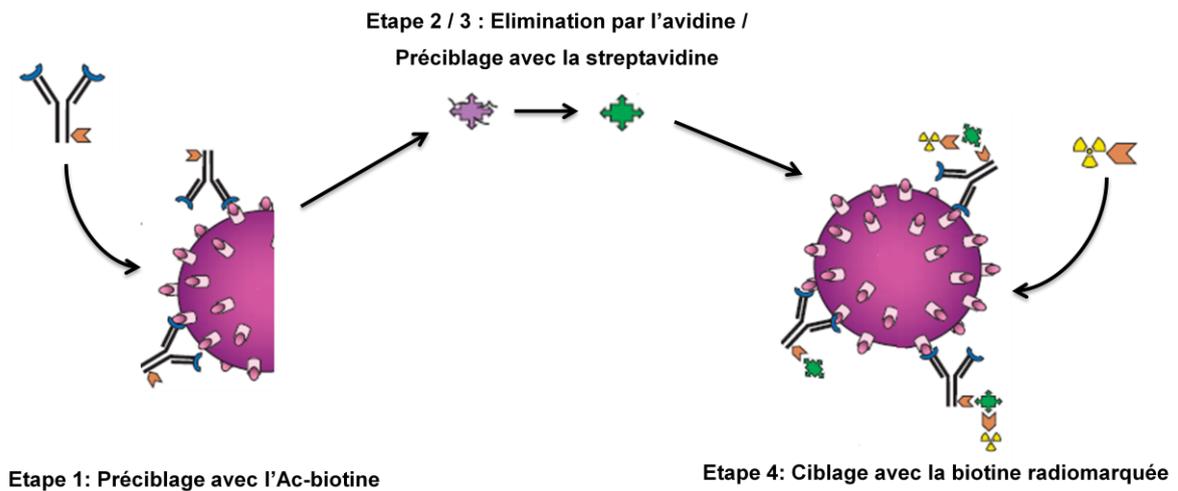
## L'optimisation de l'immuno-TEP – Les systèmes de préciblage – Principe



**Figure 13. Représentation de la technique streptavidine-biotine (D'après Goldenberg, 2006)**

L'autre technique est la conjugaison de l'Ac avec la biotine. Après élimination sanguine du vecteur, l'avidine ou la streptavidine marquée est injectée. Comme précédemment, une troisième étape est obligatoire pour accélérer l'excrétion du vecteur et limiter les complexes sanguins radiomarqués. Les travaux réalisés par Hnatowich et collaborateurs montraient que cette deuxième technique n'était pas la plus favorable car la taille de la protéine marquée induisait une élimination trop lente. Cependant, la trévalence de l'avidine/streptavidine pour la biotine restait une caractéristique intéressante pour une application comme celle du préciblage. Des équipes ont donc travaillé sur des stratégies alternatives. Sur le principe, qu'une protéine glycosylée serait rapidement prise en charge par le foie, l'équipe de Paganelli a proposé une technique en 3 / 4 temps où la molécule de chasse serait de l'avidine glycosylée (142) (fig. 14). Grâce à l'ajout d'une chaîne glycosylée, une rapide élimination hépatique du complexe avidine-vecteur permet 30min plus tard, l'injection de streptavidine. Celle-ci n'est pas radiomarquée mais sa liaison avec l'Ac biotinylé augmente le nombre de sites de liaison disponibles. L'injection de biotine radiomarquée assure une cinétique très rapide avec une augmentation du signal grâce à la tétravalence de la molécule de streptavidine.

**L'optimisation de l'immuno-TEP – Les systèmes de préciblage – Principe**

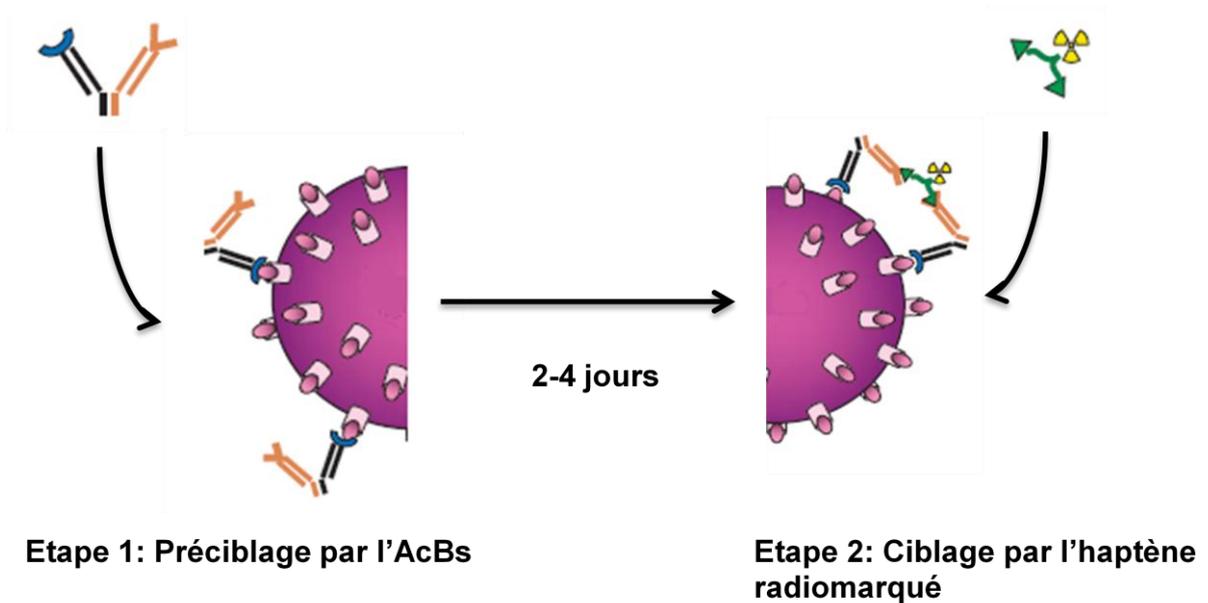


**Figure 14. Représentation de la stratégie biotine-streptavidine-biotine (D'après Goldenberg, 2006)**

**III.D.1.b Le système affinity enhancement system**

La découverte de la production d'Ac anti-EDTA par l'équipe de Readan en 1985 a ouvert la voie à l'utilisation d'Ac reconnaissant spécifiquement des molécules répondant à la définition d'un haptène (143). La technique AES est basée sur l'utilisation de constructs immunologiques qui comprennent ce type d'Ac. En effet, dans cette technique, l'un des bras d'un Ac spécifique de tumeurs a été remplacé par un bras d'un Ac anti-haptène pour former le construct bispécifique. Celui-ci pourra ainsi reconnaître des haptènes qui ont été préalablement radiomarqués. Dans un premier temps, l'AcBs est injecté. Sa distribution est lente allant de 2 à 4 jours. Puis dans un deuxième temps, un haptène radiomarqué est injecté (fig. 15). Sa distribution rapide permet de réaliser l'imagerie quelques heures après. Son hydrophilie et sa petite taille lui permettent d'être excrété rapidement par le rein. Cette caractéristique permet notamment la visualisation de lésions hépatiques ce qui était difficilement réalisable avec un Ac entier radiomarqué (144).

**L'optimisation de l'immuno-TEP – Les systèmes de préciblage – Principe**



**Figure 15. Représentation de la stratégie *Affinity Enhancement System* (D'après Goldenberg, 2006)**

Cependant, la forte affinité de l'haptène pour le vecteur immunologique circulant induit une augmentation du bruit de fond et une radiotoxicité. Pour accroître son affinité au niveau de la tumeur, l'équipe de Le Doussal propose d'augmenter la valence de l'haptène. Ces travaux initiaux portent sur la dimérisation du DTPA radiomarqué à l' $^{111}\text{In}$ . L'AcBs reconnaît le complexe DTAP-In comme un haptène. Ainsi, deux AcBs se lient à l'haptène divalent, stabilisant sa liaison. Seule une masse tumorale possédant une forte densité antigénique va permettre ce phénomène. Même si d'autres organes possèdent la cible, la stabilisation de liaison entre l'haptène et les AcBs ne sera pas possible. Le temps de résidence de l'haptène radiomarqué sera donc court. Inversement, dans la tumeur, ce phénomène va augmenter significativement le temps de résidence de l'haptène et permettre son accumulation au sein de la tumeur. Ce nouveau système est appelé *Enhancement affinity system* (145). Les recherches sur l'optimisation de la technique se sont poursuivies par la modification de l'haptène en lui-même. Cependant, du fait de la dépendance de cette reconnaissance au radionucléide utilisé, les équipes ont développé d'autres Acs ne reconnaissant plus le complexe mais une séquence peptidique (146). L'application de ce nouveau système a été présentée par l'équipe de Gruaz-Guyon en 1997. L'AcBs reconnaît la séquence histamine-succinyl-glycine (HSG) et l'ACE. L'équipe étudie plusieurs haptènes mono et divalents. Comme attendu, les divalents marqués à l'iode montrent une meilleure affinité et un

### L'optimisation de l'immuno-TEP – Les systèmes de préciblage – Principe

meilleur rapport signal / bruit de fond (147). Un dérivé de ce nouvel haptène (appelé IMP-241) est également conjugué avec le DOTA, ce qui multiplie les possibilités de radiomarquage (148). Les travaux sur l'haptène se sont accompagnés de travaux sur le vecteur immunologique. Au départ, l'AcBs est un  $F(ab')_2$  reconnaissant deux cibles. Les Fab' produits par digestion enzymatique sont liés par des petites molécules chimiques au niveau de leur région charnière (145,149,150) (fig. 16).

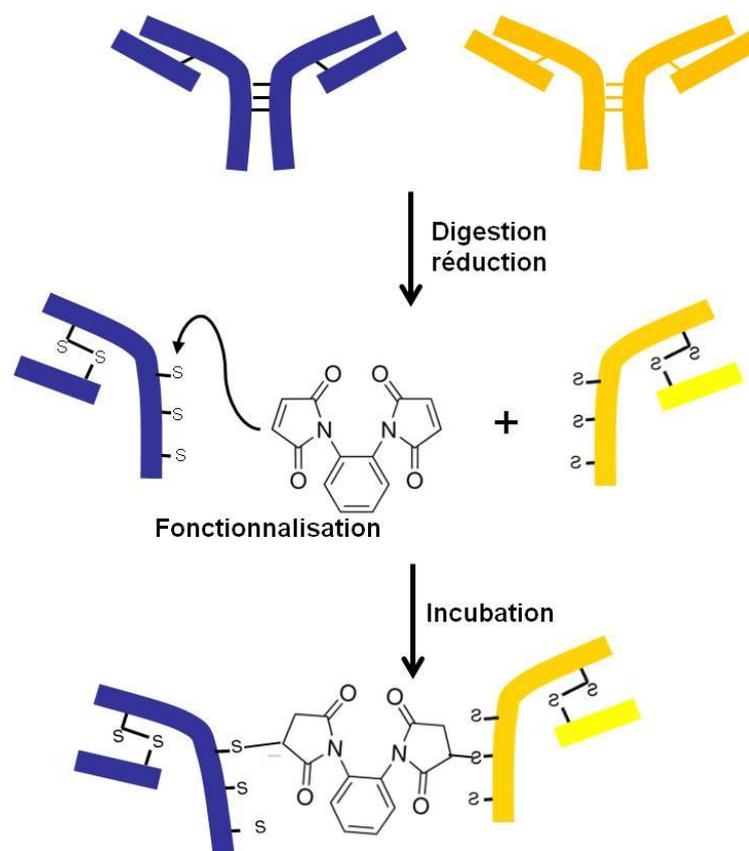


Figure 16. Schéma de synthèse d'un  $F(ab')_2$  bispécifique par voie chimique

Suivant la même logique que pour l'haptène, l'équipe de Goldenberg a augmenté la valence de son vecteur par l'ajout d'un troisième fragment Fab (151). Leur technique appelée *Dock and Lock* (DNL) est basée sur l'interaction protéine-protéine entre la sous-unité régulatrice R de la kinase dépendante de l'AMP cyclique (PKA) et le domaine d'ancrage (AD pour *anchor domain*) des protéines d'ancrage de la PKA. Deux fragments Fab reconnaissant l'Ag sont fusionnés avec des sous-unités R et se dimérisent spontanément. Un troisième fragment reconnaissant l'haptène est fusionné avec l'AD. Ce domaine se lie

### L'optimisation de l'immuno-TEP – Les systèmes de préciblage – Principe

spécifiquement au dimère F(ab)<sub>2</sub>. Le vecteur immunologique ainsi synthétisé est appelé TriFab (TF) (fig. 17).

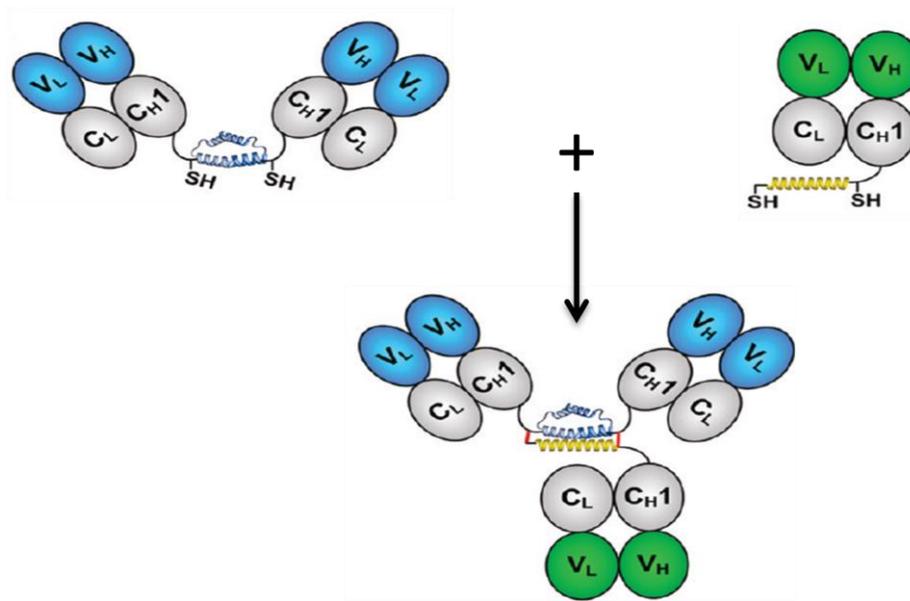


Figure 17. Schéma de synthèse de TriFab par le système DNL (D'après Rossi et al., 2006)

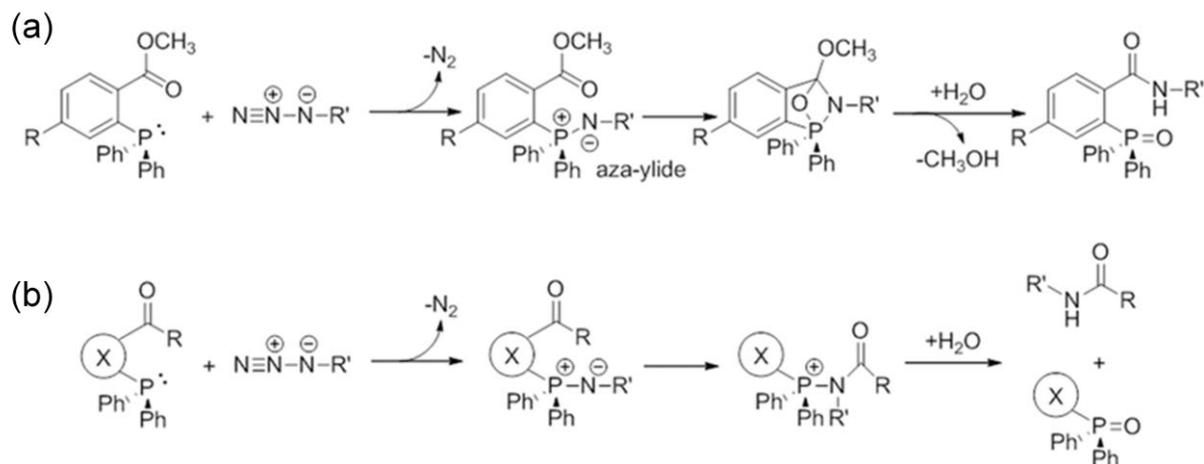
Le vecteur possède une taille proche de celle d'un Ac (environ 150kDa). Cependant, sa clairance est rapide du fait de la métabolisation enzymatique des différents sites d'ancrage du vecteur *in vivo*. De ce fait, le délai nécessaire entre les deux étapes d'injection est réduit de 4 jours à 1 jour en moyenne.

#### III.D.1.c Le système de chimie bio-orthogonale

Le système de préciblage par la chimie orthogonale est très récent. Les travaux de chimie de Huisgen de 1963 sur la cycloaddition dipolaire en 1 et 3 ont été repris par les équipes de Meldal et Sharpless indépendamment (152–154). La réaction entre une fonction azoture et une fonction alcyne permet la formation d'un cycle triazolé stable. Cette réaction ayant un taux de réaction élevé et une cinétique extrêmement rapide, l'idée de son utilisation pour la fonctionnalisation de vecteur par des chélatants a été proposée (155,156). Cependant, l'utilisation du Cu(I) comme catalyseur de la réaction empêche une application *in vivo* de cette méthode. Très récemment, plusieurs adaptations de la cycloaddition de Huisgen sans la présence de Cu(I) ont été décrites. La première est une réaction de Staudinger mettant en jeu des fonctions phosphines et un azoture et formant un pont aminé. Cette réaction existe

### L'optimisation de l'immuno-TEP – Les systèmes de préciblage – Principe

avec 2 variantes : soit par l'utilisation d'un dérivé carboxylique électrophile tout près duquel est fixée la phosphine et qui induira la formation de la liaison amine entre l'azote et le carboxyle (variante « avec trace ») (fig.18a), soit par la fonctionnalisation de la phosphine sur un groupement qui sera éliminé lors de la réaction (variante « sans trace ») (fig.18b).



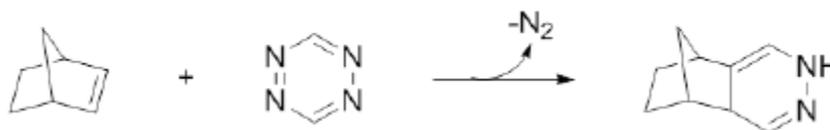
**Figure 18. Réaction de Bezzoni-Staudinger (Knight et al., 2014)**  
 (a) variante dite « avec trace » et (b) variante dite « sans trace »

Vugt et collaborateurs ont évalué la possibilité du préciblage avec cette réaction (158). L'Ac anti-CD44v6 est modifié par des fonctions azoture au niveau de son fragment Fc. Une desferroxamine ou un DOTA conjugué à une fonction phosphine sont injectés dans un deuxième temps. La molécule est marquée avec du <sup>89</sup>Zr, du <sup>68</sup>Ga ou encore du <sup>177</sup>Lu. Les résultats sont décevants car la réaction est trop lente avec un taux de réaction sub-optimale pour une application *in vivo*. De plus, la formation d'un composé indésirable empêche la réaction dans le sérum de souris (95% de réduction par rapport au tampon phosphate) rendant inefficace le ciblage.

La deuxième méthode utilise des cyclooctynes dans lesquelles la présence d'alcynes intracycliques permet la cycloaddition. La réaction est appelée *Strain-Promoted Alkyn-Azide Cycloaddition* ou SPAAC. La difficulté de synthèse des cyclooctynes (étapes, faible rendement...) rend délicate leur utilisation dans le cadre de la biologie moléculaire. De plus, les résultats *in vivo* montrent que la faible hydrophilie des cyclooctènes induit une liaison aux protéines notamment l'albumine, avec une cinétique d'élimination lente de la molécule (159).

### L'optimisation de l'immuno-TEP – Les systèmes de préciblage – Principe

La troisième méthode met en jeu une réaction de Diels-Alder à demande inverse (*Inverse-Demand Diels–Alder reaction* ou IDDA). Elle semble être la plus intéressante en préciblage à l'heure actuelle. La conjugaison est réalisée par la cycloaddition entre une tétrazine et des dérivés alcènes cycliques (Fig.19).



**Figure 19. Exemple de réaction IDDA (Knight et al., 2014)**

L'équipe de Rossin et coll. expérimente l'utilisation de ce système en SPECT et en RIT (160,161). Dans une première étude, l'équipe fonctionnalise un dérivé de la tétrazine avec un DOTA et greffe des trans-cyclooctènes (TCO) sur l'anticorps CC49 (anti-tag72). Ils évaluent *in vivo* la stabilité de l'Ac. Les résultats montrent qu'à 24h, 75% des Ac-TCO restent réactifs à la tétrazine. Puis dans une seconde expérience, l'Ac, modifié ou non avec les TCO, est injecté à des souris greffées avec une souche de carcinome du colon. Après 27h, la tétrazine marquée avec de l'<sup>111</sup>In est injectée. Seul l'Ac-TCO retient la tétrazine marquée avec une captation de 4,2%/DI à 3h et un rapport tumeur sur muscle de 13,1 alors qu'il n'est que de 0,5 pour l'Ac seul. Cependant, la présence résiduelle de l'Ac-TCO dans le sang entraîne une augmentation importante du bruit de fond. Dans une deuxième étude, l'équipe utilise un système en 3 étapes avec un agent de clairance pour réduire le temps de circulation de l'Ac-TCO. Les résultats montrent que 7.45%/DI est captée par la tumeur à 3h pi de la tétrazine marquée au <sup>177</sup>Lu. Le rapport tumeur sur muscle est alors de 141.

Ces deux études sont des preuves de concept que la chimie bio-orthogonale doit être évaluée comme un nouveau système de préciblage.

### **III.D.2 Applications des systèmes de préciblage en imagerie TEP**

Dès le début des années 90, les systèmes biotine-streptavidine et AES ont été évalués chez l'homme tout d'abord en imagerie TEMP puis très rapidement en RIT (129,162,163). Depuis quelques années, l'émergence du principe de théranostic a restimulé un travail de recherche autour des émetteurs pour la TEP et de l'utilisation de ces systèmes en imagerie.

La stratégie streptavidine-biotine a ainsi été évaluée avec le  $^{64}\text{Cu}$  dès 2003 par l'équipe de Lewis (164). Un Ac conjugué à la streptavidine reconnaissant l'Ag Ep-CAM est injecté puis après une chasse, la  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-biotine est injectée. L'équipe évalue l'effet de différentes doses de biotine et compare le système de préciblage avec l'Ac seul directement marqué au  $^{64}\text{Cu}$ . Bien que l'activité dans la tumeur soit importante pour l'Ac radiomarké, la forte circulation du traceur limite son intérêt en imagerie. Les données présentées pour cette biodistribution sont étonnantes avec une rétention dans la tumeur de 80.3 %DI / g alors même que 20.4 %DI / g est présente dans le sang. Ces résultats semblent donc improbables et leur interprétation reste limitée. Il est tout de même intéressant de retenir que dans cette étude, le construct possède un rapport signal / bruit plus fort et qu'il paraît donc plus favorable pour l'imagerie. Plus récemment, le  $^{64}\text{Cu}$  a également été utilisé dans un système de streptavidine – biotine (165). Ce système innovant associe l'affinité de l'annexine V pour les phosphatidylsérines lors de l'apoptose cellulaire et l'affinité de la biotine pour la streptavidine. L'annexine V conjuguée à une biotine est injectée dans une première étape en remplacement d'un AcBs. Puis après une chasse, une streptavidine liée à une  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-biotine est injectée ciblant à son tour l'annexine V. Le choix de marquer la biotine au  $^{64}\text{Cu}$  puis de l'associer à la streptavidine est une manière astucieuse d'employer des produits déjà commercialisés comme la biotine-DOTA. L'accumulation de la streptavidine reste faible mais les rapports tumeur traitée / sang et tumeur traitée / tumeur de référence sont supérieurs à 2 et 8 respectivement ce qui rend le système favorable pour l'imagerie. Ces travaux montrent les multiples possibilités des systèmes streptavidine-biotine. Dans la continuité de cette démonstration, l'équipe de Kuno a proposé d'évaluer le niveau d'hypoxie des tumeurs grâce à une protéine fusionnée avec le domaine de dégradation dépendant de l'oxygène de la protéine HIF-1 (*hypoxia-inducible factor-1*) et conjuguée à la streptavidine. Le facteur de transcription HIF-1, dégradé dans des conditions de normoxie, est un marqueur de l'agressivité et de la pharmacorésistance tumorale lié à l'hypoxie de la tumeur.

### **L'optimisation de l'immuno-TEP – Les systèmes de préciblage – Applications en TEP**

L'accumulation du vecteur-streptavidine reflète l'activité de HIF-1 et donc le niveau d'oxygénation de la tumeur. Afin de visualiser le vecteur, l'équipe marque une biotine au  $^{18}\text{F}$ . L'étude ne permet pas de mettre en avant une meilleure spécificité du traceur par rapport aux autres traceurs à l'étude dans l'hypoxie ou vis-à-vis du  $^{18}\text{F}$ -FDG. Cependant, elle valide le préciblage passif comme une nouvelle modalité de ces systèmes.

Le préciblage par la méthode de chimie bio-orthogonale a également été évalué en imagerie TEP par l'équipe de Zeglis. Ils utilisent un anticorps anti-A33 modifié par des TCO et un dérivé de la tétrazine fonctionnalisé par un NOTA et marqué au  $^{64}\text{Cu}$  (166). Dans cette étude, l'équipe n'utilise pas de chasse, ce qui entraîne une forte activité dans le sang 12h pi de la tétrazine. De plus, le dérivé tétrazine utilisé possède une cinétique d'excrétion longue avec une présence importante dans les fèces à 12h. Malgré cela, l'accumulation dans la tumeur est relativement élevée avec un pourcentage de captation tumorale de 4.1%DI/g à 1h et qui reste stable sur 24h. L'amélioration apportée par l'équipe de Rossin plus récemment et présentée dans le chapitre précédent est une perspective intéressante pour améliorer ce système (161) et sa future utilisation avec des émetteurs de positons de période longue.

En AES, de nombreuses études sont en cours en imagerie TEP. Le TF2, anti-ACE humanisé / anti-HSG, a déjà fait l'objet de plusieurs études précliniques. En 2006, Mc Bride et al. marquent l'haptène IMP-325 (haptène di-HSG issu de l'haptène IMP-288) avec de  $^{124}\text{I}$  et comparent la technique de préciblage avec le  $^{18}\text{F}$ -FDG et le fragment  $^{124}\text{I}$ -Fab' anti-ACE (167). Pour le préciblage, l'accumulation de radioactivité dans la tumeur est maximale 2h post-injection de l'haptène avec une stabilité de l'intensité sur 24h. L'excrétion de l'haptène permet d'obtenir un rapport signal / bruit optimal à 24h. En comparaison, le  $^{124}\text{I}$ -Fab' ne permet de réaliser des images qu'à 24h car son niveau de captation stomacale reste très élevé. Le  $^{18}\text{F}$ -FDG permet également une bonne visualisation de la tumeur à 2h avec un rapport tumeur / sang qui lui est favorable. Cependant, la quantification de la radioactivité dans les organes *ex vivo* montre que le pourcentage de la dose injectée par gramme de tumeur est supérieur pour le système AES.

Suite à ces résultats favorables, l'équipe évalue l'impact du préciblage sur la visualisation en TEP des petites lésions (168). Après avoir injecté des cellules de carcinome hépatique humain par voie intraveineuse, un protocole d'imagerie est réalisé pour visualiser les

### **L'optimisation de l'immuno-TEP – Les systèmes de préciblage – Applications en TEP**

nodules formés dans les poumons. Le construct permet la détection des nodules pulmonaires d'un diamètre inférieur à 0,3 mm alors que le  $^{18}\text{F}$ -FDG ne les cible pas. Le système TF2-IMP-288 a également montré son intérêt avec des émetteurs de positons de demi-vies courtes comme le  $^{68}\text{Ga}$  ou le  $^{18}\text{F}$  (169,170).

Les premiers travaux avec le  $^{68}\text{Ga}$  ne sont pas récents. Dès 1998, l'équipe de Welch travaille sur un Ac anti-chélatant (171). Ces travaux sont dans la lignée de ceux menés par l'équipe de Readan. Ils sélectionnent un Ac anti- $^{68}\text{Ga}$ -HBED-CC. L'HBED-CC (acide *N,N'*-bis[2-hydroxy-5-(carboxyéthyl)benzyl]éthylènediamine-*N,N'*-diacétique) est un chélatant acyclique du  $^{68}\text{Ga}$ . Pour évaluer l'intérêt de cet Ac, ils produisent un AcBs anti-chélatant / anti-CD44v6. Comme le complexe  $^{68}\text{Ga}$ -HBED-CC existe sous la forme de 2 énantiomères, chacun génère un Ac qui lui est spécifique. L'équipe examine donc les différents AcBs formés en imagerie TEP. De façon intéressante, ils évaluent également l'amélioration du ciblage dans la tumeur grâce à l'obtention d'un haptène divalent. Comme précédemment et de façon indépendante, ils confirment l'intérêt de la multivalence pour la sensibilité de la technique. En 2001, Schuhmacher et collaborateurs reprennent l'Ac anti-chélatant et produisent un anticorps bispécifique anti-MUC1 / anti- $^{68}\text{Ga}$ -HBED-CC. Après avoir validé leur travaux en préclinique (172), ils évaluent le vecteur en clinique sur 10 patientes atteintes d'un cancer du sein exprimant MUC-1 (173). Les résultats sont cependant décevants car les rapports tumeur / tissu sain et tumeur / sang sont faibles et ne permettent pas une bonne détection. Les auteurs expliquent ce bilan par une mauvaise reconnaissance de l'antigène par l'anticorps et une internalisation de celui-ci qui limite la quantité de chélatants fixés à la tumeur. La comparaison avec le  $^{18}\text{F}$ -FDG n'étant pas favorable, l'équipe a décidé de ne pas poursuivre les essais. Très récemment, l'équipe de Wittrup a produit un ScFv par mutagénèse dont l'affinité pour le DOTA est inférieure à la nanomole (174). L'équipe propose la création d'un vecteur bispécifique IgG-ScFv reconnaissant le chélatant en lui-même. Bien que ces travaux se soient orientés sur la thérapeutique, ils présentent l'intérêt d'une ré-exploration des Ac anti-chélatants et proposent l'application du préciblage avec des vecteurs immunologiques issus du génie génétique. Comme nous l'avons vu précédemment, la problématique de l'haptène chélatant se situe dans la reconnaissance de l'haptène par l'Ac quand celui-ci n'est pas radiomarqué avec l'atome ayant servi à la production de l'Ac. Dans ce cas, l'affinité de

### **L'optimisation de l'immuno-TEP – Les systèmes de préciblage – Applications en TEP**

l'Ac diminue dramatiquement, rendant le ciblage inefficace. Cela implique que ces systèmes soient exclusivement réservés à un type donné de radionucléide.

Enfin, en chimie bio-orthogonale, une étude préliminaire datant de 2014 présente les résultats *in vitro* de l'utilisation de dextrans-tétrazine-DTPA marqué au  $^{68}\text{Ga}$  dans un modèle cellulaire exprimant l'Ag A33 (175). Un Ac anti-A33 modifié par des TCO est préalablement incubé durant 1h30min puis la tétrazine marquée est ajoutée en quantité croissante. Le ciblage de l'Ac par le dextran est ainsi validé. A l'heure actuelle, cette étude est la seule présentant le système de préciblage de chimie bio-orthogonale avec le  $^{68}\text{Ga}$ . La cinétique des dextrans relativement rapide paraît intéressante pour l'utilisation de cette méthode avec des émetteurs de positons de période courte comme le  $^{68}\text{Ga}$ .

Le  $^{68}\text{Ga}$  est aujourd'hui l'un des émetteurs de positon les plus étudiés. Son accessibilité et sa radiochimie plus aisée que celle du  $^{18}\text{F}$  le prédisposent à un développement en clinique. En AES, il est évalué à l'heure actuelle dans des essais multicentriques notamment en France (176).

Afin de présenter la radiochimie du  $^{68}\text{Ga}$  et les problèmes liés à l'utilisation de ce radionucléide en imagerie TEP avec les techniques de préciblage, le prochain chapitre réunit les travaux réalisés au cours des décennies précédentes sur la recherche dans la production du  $^{68}\text{Ga}$  et dans la complexation du Ga. Il présente également les avancées majeures dans le domaine des chélatants bifonctionnels du  $^{68}\text{Ga}$ .

# CHAPITRE 2 : LA RADIOCHIMIE DU $^{68}\text{Ga}$

## DANS L'IMAGERIE PAR PRÉCIBLAGE

### I Production du $^{68}\text{Ga}$

#### I.A Propriétés physiques du $^{68}\text{Ga}$

Il existe plusieurs radio-isotopes du Ga. Trois d'entre eux ont fait l'objet de recherche en imagerie nucléaire le  $^{67}\text{Ga}$ , le  $^{68}\text{Ga}$  et de façon plus exotique le  $^{66}\text{Ga}$ . Les caractéristiques des différents isotopes sont détaillées dans le tableau 5.

Radio-isotope	Mode de décroissance	Période	Principaux photons $\gamma$	Energie maximale du $\beta^+$
$^{66}\text{Ga}$	$\beta^+$ , $\gamma$	9,49 h	511 keV (56%) 2752 keV (44%)	4153 keV
$^{67}\text{Ga}$	Capture électronique (CE) ; $\gamma$	78,1 h	93,3 keV (38,6%) 184,6 keV (20,8%) 300,2 keV (16,0%) 393,0 keV (4,2%)	-
$^{68}\text{Ga}$	$\beta^+$ , $\gamma$	67,71 min	511 keV 1077 keV (3,22%)	1899 keV

Tableau 5. Caractéristiques principales des isotopes cliniques du Ga

Le  $^{68}\text{Ga}$  est un émetteur de positons émettant une particule  $\beta^+$  à plus de 89%. L'énergie maximale du  $\beta^+$  est de 1899 keV et son parcours moyen est de 2,4 mm. En comparaison, celui du  $^{18}\text{F}$  est plus faible à 0,5 mm. Comme évoqué au chapitre 1, un parcours moyen long est l'une des causes de dégradation de la résolution spatiale. Cette caractéristique est donc importante à considérer lors de son utilisation. D'autre part, le  $^{68}\text{Ga}$  émet dans 3,22% des cas

**Production du  $^{68}\text{Ga}$  – Propriétés physiques**

un photon  $\gamma$  de haute énergie (1077 keV) qui doit également être pris en compte dans l'impact dosimétrique de ce radionucléide (177). Il décroît en  $^{68}\text{Zn}$  qui est un élément stable (fig. 20).

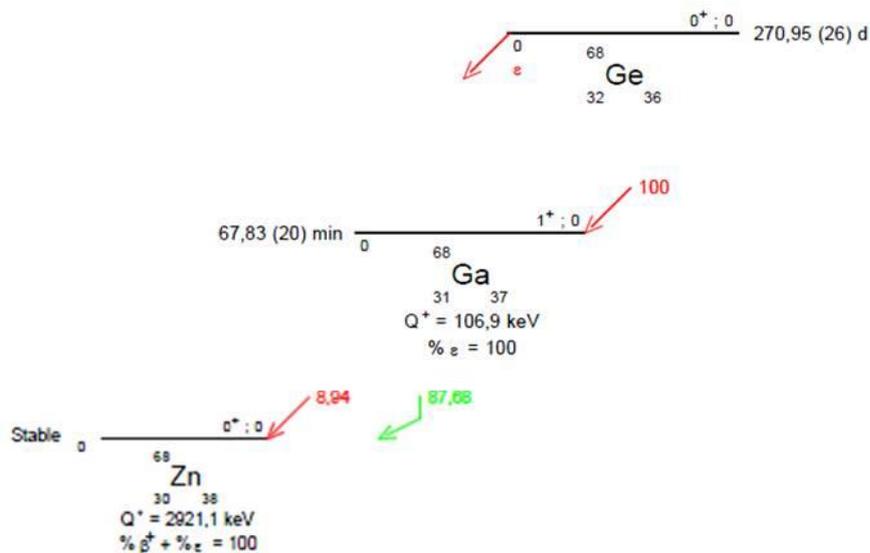


Figure 20. Schéma de filiation simplifié du  $^{68}\text{Ga}$  (d'après LNHB / CEA)

**I.B Généralités sur les générateurs**

Actuellement la majorité des émetteurs de positons sont produits à partir d'accélérateurs de particules ou de cyclotrons de faibles énergies (9-19 MeV) produisant exclusivement des émetteurs de période radioactive courte :  $^{15}\text{O}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$  et  $^{13}\text{N}$ . La plupart de ces cyclotrons sont dédiés à la production industrielle du  $^{18}\text{F}$ -Fluorodéoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) principal médicament utilisé en imagerie TEP (178).

Les générateurs isotopiques sont une alternative à la production *in situ* par un cyclotron. Ils étaient appelés historiquement une « vache » et furent initialement développés pour le  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  dès 1954 (179). Le principe repose sur la séparation radiochimique entre l'élément père de période radioactive longue contenu dans le générateur et son fils de période plus courte issu de sa désintégration. Idéalement, le fils est collecté avec une excellente pureté radionucléidique (c'est-à-dire sans contamination par d'autres radionucléides) et radiochimique (sous la forme chimique intéressante pour le marquage et sans impuretés chimiques et radioactives). Cette séparation est possible car les deux éléments ne sont pas

### Production du $^{68}\text{Ga}$ – Généralités sur les générateurs

des isotopes et ne possèdent donc pas les mêmes propriétés chimiques. Plusieurs techniques de séparation ont été développées : l'extraction par solvant, l'échange d'ions, l'électrochimie, la sublimation ou encore la chromatographie d'adsorption (180).

Le principe de la technique est la suivante :

- 1) Fabrication du générateur : après production de l'élément père du radionucléide d'intérêt dans une centrale nucléaire ou par un cyclotron, celui-ci est placé dans un système chromatographique. Ce système est constitué d'une phase stationnaire avec comme caractéristique principale une forte affinité pour le radionucléide père et une faible affinité pour le radionucléide fils. A ce stade, le générateur est livré au service utilisateur.
- 2) Utilisation : dans le service, le radionucléide père contenu dans le générateur se désintègre en son élément fils. Par séparation chimique, seul le radionucléide fils sera récupéré. L'ensemble solvant et radionucléide s'appelle un éluat. La technique de séparation est appelée communément une élution (fig. 21).

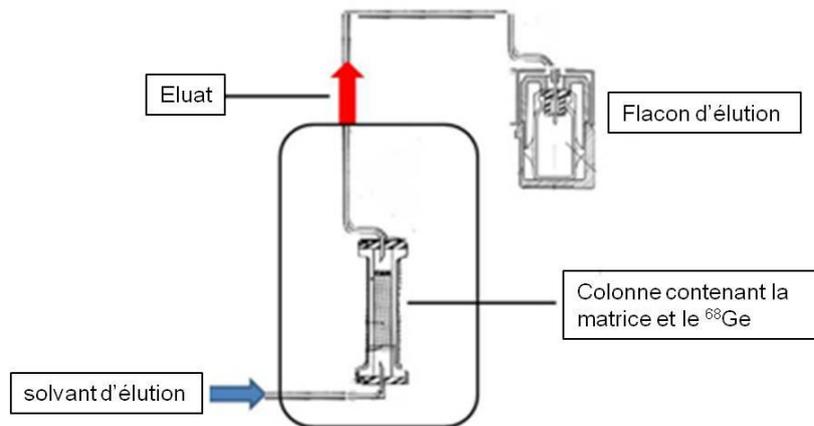


Figure 21. Schéma d'élution d'un générateur  $^{68}\text{Ge} / ^{68}\text{Ga}$

### I.B.1 Le principe d'équilibre physique d'un générateur

Le principe de la décroissance d'un élément père (noté 1) en son élément fils (noté 2) est exprimé par :

$$-dN_1/dt = \lambda_1 \text{ et } N_1 = N_1^0 e^{-\lambda_1 t} \quad [1]$$

où  $N$  représente le nombre d'atomes à un temps  $t$ .  $N^0$  indique la quantité au temps  $t = 0$  et  $\lambda$  est la constante radioactive du radionucléide. La relation liant cette constante à la période radioactive  $T$  de décroissance de l'élément est :

$$\lambda = \frac{\text{Ln}(2)}{T} \quad (\text{a})$$

L'élément fils est formé en fonction du taux de décroissance du père,  $\lambda_1 N_1$ . Cependant, le fils lui-même décroît selon un taux  $\lambda_2 N_2$  et la production réelle en élément fils s'exprime donc par :

$$\frac{dN_2}{dt} = \lambda_1 N_1 - \lambda_2 N_2 = \lambda_1 N_1^0 e^{-\lambda_1 t} - \lambda_2 N_2^0 e^{-\lambda_2 t} \quad [2]$$

une solution particulière de cette équation différentielle est :

$$N_2 = \frac{\lambda_1}{\lambda_2 - \lambda_1} N_1^0 (e^{-\lambda_1 t} - e^{-\lambda_2 t}) + N_2^0 e^{-\lambda_2 t} \quad [3]$$

Si le précurseur a une période radioactive ( $T$ ) plus longue que celle de l'élément fils ( $T_1 > T_2$ , ce qui correspond à  $\lambda_1 < \lambda_2$ ) le facteur  $e^{-\lambda_1 t}$  est négligeable devant  $e^{-\lambda_2 t}$  ainsi que  $N_2^0 e^{-\lambda_2 t}$  pour un temps  $t$  suffisamment grand. L'équation [3] se simplifie :

**Production du  $^{68}\text{Ga}$  – Généralités sur les générateurs – Le principe d'équilibre physique d'un générateur**

$$N_2 = \frac{\lambda_1}{\lambda_2 - \lambda_1} N_1^0 e^{-\lambda_1 t} \quad [4]$$

Comme  $N_1 = N_1^0 e^{-\lambda_1 t}$ , le ratio des nombres d'atomes des deux radionucléides est :

$$\frac{N_1}{N_2} = \frac{\lambda_2 - \lambda_1}{\lambda_1} \quad [5]$$

Et par conséquence, le ratio des activités  $A$  des deux radionucléides devient :

$$\frac{A_1}{A_2} = \frac{\lambda_2 - \lambda_1}{\lambda_2} = 1 - \frac{\lambda_1}{\lambda_2} \quad [6]$$

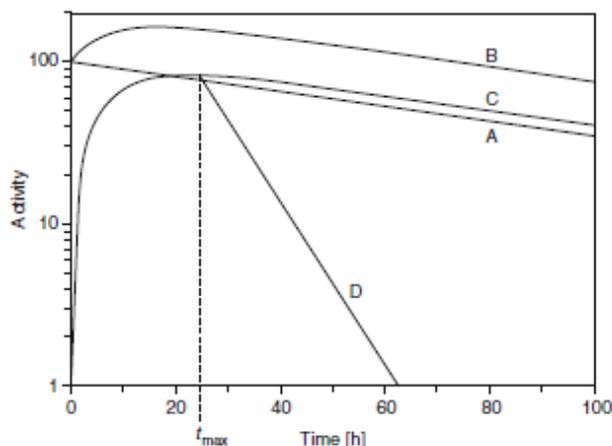
Dans le cas où la période du père est très grande devant la période du fils ( $T_1 \gg T_2$ ), les équations [5] et [6] se simplifient jusqu'à obtenir  $A_1 = A_2$ . Dans ce type d'équilibre, l'activité de l'élément fils est égale à celle du père.

Dans ce cas, le temps nécessaire pour obtenir l'activité maximale du fils s'écrit :

$$t = \frac{1}{\lambda_2 - \lambda_1} \ln \frac{\lambda_2}{\lambda_1} \quad [7]$$

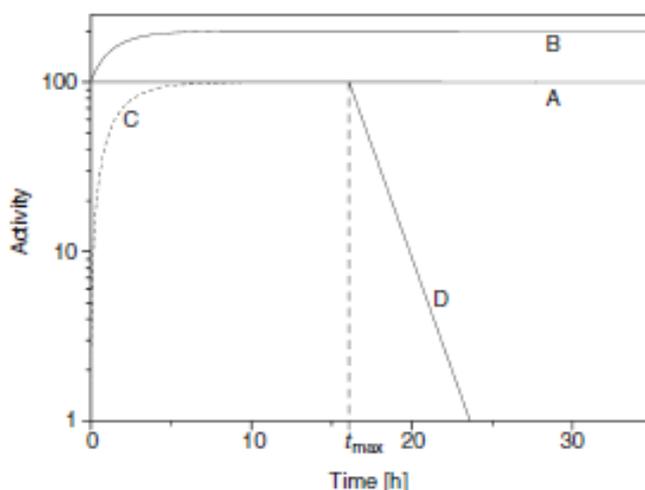
Comme le montre l'équation [7], l'équilibre radioactif entre les éléments père et fils est dépendant des constantes de décroissance et donc des périodes radioactives. Lorsque le ratio des périodes du père et du fils est inférieur à 10, on définit l'équilibre comme un équilibre transitoire (cas du générateur  $^{99}\text{Mo}$  ( $T = 66 \text{ h}$ ) /  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ( $T = 6 \text{ h}$ )). Si ce ratio est plus important, l'équilibre devient alors séculaire et l'activité maximale élue sera obtenue pour un intervalle d'au moins 10 périodes du fils entre deux éluions (cas du générateur  $^{68}\text{Ge}$  ( $T = 270 \text{ j}$ ) /  $^{68}\text{Ga}$  ( $T = 68 \text{ min}$ )). Les figures 22 et 23 illustrent ces équilibres par l'exemple du générateur  $^{99}\text{Mo}$  /  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  et celui du générateur de  $^{68}\text{Ge}$  /  $^{68}\text{Ga}$ .

**Production du  $^{68}\text{Ga}$  – Généralités sur les générateurs – Le principe d'équilibre physique d'un générateur**



**Figure 22. Cinétique de transition pour un générateur  $^{99}\text{Mo} / ^{99\text{m}}\text{Tc}$  (Vertes et al., 2010)**

(A) courbe de décroissance de l'activité du père, (B) courbe de la cinétique des activités cumulées du père et du fils, (C) courbe de l'activité du fils dans la fraction du père et (D) courbe de décroissance de l'activité du fils



**Figure 23. Cinétique séculaire pour un générateur  $^{68}\text{Ge} / ^{68}\text{Ga}$  (Vertes et al., 2010)**

(A) courbe de décroissance de l'activité du père, (B) courbe de la cinétique des activités cumulées du père et du fils, (C) courbe de l'activité du fils dans la fraction du père et (D) courbe de décroissance de l'activité du fils

Dans l'équilibre séculaire (fig. 23), la période du père est tellement grande devant celle du fils que la cinétique de décroissance de l'activité du père (A) et la courbe de l'activité du fils dans la fraction du père (C) suivent une asymptote, ce qui n'est pas le cas dans l'équilibre transitoire (fig. 22). En d'autres termes, le rendement d'élution pour un générateur séculaire est toujours de 100 % de l'activité maximale théorique si l'intervalle minimum entre deux éluions est de 10 périodes du fils.

## **I.B.2 Les considérations pratiques**

En pratique courante, l'activité éluee est rarement identique à l'activité maximale calculée. Cette observation est liée à plusieurs facteurs :

L'intervalle entre deux éluions de 10 périodes est souvent trop long pour une utilisation pratique des générateurs (pour le  $^{68}\text{Ga}$  cela reviendrait à attendre 14,1 h). L'activité à 90 % de l'activité maximale est considérée comme suffisante pour le marquage de molécules. Dans notre exemple, comme le montre la courbe de l'activité du fils (C) de la figure 23, l'intervalle de temps nécessaire pour obtenir 90 % de l'activité maximale en  $^{68}\text{Ga}$  est alors de 3,4 h.

D'autre part, la durée de vie d'un générateur est impactée par la stabilité de la fixation du précurseur sur la colonne. Au fur et à mesure des éluions, le générateur se dégrade notamment par l'irradiation permanente de l'élément père sur la matrice sur laquelle il est fixé. Cette détérioration entraîne son décrochage et une diminution non voulue de l'activité restante dans le générateur. L'écart est de plus en plus important entre les activités calculées et mesurées. Il en découle une diminution du rendement d'éluion. Il se définit comme le pourcentage du rapport entre les activités mesurées et calculées.

De plus, l'instabilité chimique provoquée par les solvants d'éluion est susceptible d'entraîner une modification de la forme chimique du radionucléide d'intérêt. Elle entraîne notamment une variation du degré d'oxydation de l'ion ou encore la formation d'un complexe. Ces nouvelles formes chimiques n'étant pas celles attendues, aucune réaction de marquage ne sera observée. Le rendement de marquage sera donc très faible voire nulle. Il s'agit donc d'un facteur essentiel lors du radiomarquage de vecteurs. Pour les médicaments radiopharmaceutiques, ce phénomène entraîne une réduction importante de l'activité spécifique (AS) du produit radiomarké. L'AS se définit comme le nombre de Becquerels d'un produit radioactif par unité de masse. De façon pratique, plus l'AS est faible, plus la quantité de produit à injecter au patient doit être élevée pour obtenir une image satisfaisante. Elle devient un facteur limitant dans l'utilisation de certains traceurs possédant une activité biologique propre, comme par exemple les anticorps.

Malgré ces contraintes, les générateurs sont aujourd'hui indispensables pour la production de radionucléides à période radioactive courte. Leurs avantages sont une autonomie des services ne possédant pas de cyclotron, une durée de vie majoritairement

### **Production du $^{68}\text{Ga}$ – Généralités sur les générateurs – Les générateurs produisant des émetteurs de positons**

élevée, une pureté radiochimique et radionucléidique maintenue grâce à différents traitements et à la technique de production en elle-même. De plus, les générateurs sont simples d'utilisation et entraînent une dosimétrie du personnel acceptable.

#### **I.B.3 Les générateurs produisant des émetteurs de positons**

Les générateurs ont des durées de vie extrêmement variables allant de quelques jours à plusieurs mois. La durée de vie dépend de la période radioactive, de l'activité et de la stabilité de fixation du radionucléide père. Comme décrit précédemment, seuls les couples père / fils ayant un équilibre de décroissance adéquat vont permettre la production d'un générateur. Cette propriété de décroissance radioactive n'existe pas pour tous les radionucléides (181).

Plusieurs générateurs produisant des émetteurs de positons sont actuellement commercialisés. En France, leur application reste encore limitée à la recherche clinique ou préclinique. Cependant dans de nombreux pays, les générateur de  $^{82}\text{Sr}/^{82}\text{Rb}$  et de  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  sont utilisés en pratique clinique courante. Le tableau 6 recense les générateurs potentiellement disponibles pour l'imagerie TEP.

Les générateurs sont classés selon la période des émetteurs  $\beta^+$  qu'ils produisent. Les émetteurs à période courte (< 1h) seront uniquement disponibles pour la perfusion de l'éluat sans modification préalable, alors que ceux à période plus longue pourront servir sous la forme de solution de précurseur pour le radiomarquage des vecteurs.

**Production du  $^{68}\text{Ga}$  – Généralités sur les générateurs – Les générateurs produisant des émetteurs de positons**

Générateurs	Père		Fils		
	Période	Période	Pourcentage de $\beta^+$ émis (%)	Energie max. du $\beta^+$ (MeV)	Applications
$^{82}\text{Sr} / ^{82}\text{Rb}$	25,60 j	1,27 min	95	1,41	perfusion
$^{140}\text{Nd} / ^{140}\text{Pr}$	3,37 j	3,39 min	51	0,544	perfusion
$^{118}\text{Te} / ^{118}\text{Sb}$	6,00 j	3,60 min	74	0,882	perfusion
$^{122}\text{Xe} / ^{122}\text{I}$	20,10 h	3,60 min	77	1,09	perfusion
$^{128}\text{Ba} / ^{128}\text{Cs}$	2,43 j	3,62 min	69	0,869	perfusion
$^{134}\text{Ce} / ^{134}\text{La}$	3,16 j	6,4 min	63	0,756	perfusion
$^{62}\text{Zn} / ^{62}\text{Cu}$	9,26 h	9,74 min	97	1,28	marquage et perfusion
$^{52}\text{Fe} / ^{52\text{m}}\text{Mn}$	8,28 j	21,10 min	97	1,13	perfusion
$^{68}\text{Ge} / ^{68}\text{Ga}$	270,80 j	68,10 min	89	0,74	marquage et perfusion
$^{110}\text{Sn} / ^{110\text{m}}\text{In}$	4,10 h	1,15 h	62	0,623	marquage
$^{44}\text{Ti} / ^{44}\text{Sc}$	60,3 a	3,93 h	94	0,597	marquage
$^{72}\text{Se} / ^{72}\text{As}$	8,4 j	1,083 j	88	1,02	marquage

**Tableau 6. Générateurs disponibles pour l'imagerie TEP (d'après l'AIEA, 2010)**

## **I.C Le générateur $^{68}\text{Ge}$ / $^{68}\text{Ga}$**

Si les générateurs de  $^{99}\text{Mo}$  /  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  sont couramment utilisés en clinique, la technique tend à se développer pour la production du  $^{68}\text{Ga}$ .

La production du  $^{68}\text{Ga}$  à partir du  $^{68}\text{Ge}$  a été décrite dès les années 50 mais elle utilisait d'autres méthodes de séparation dont l'extraction. Les protocoles employaient différents solvants organiques comme la méthyl-éthyl-cétone, l'acétyl-acétone, le chloroforme (182,183). En 1978, Mirzadeh et al. proposent une technique de distillation du  $^{68}\text{Ge}$  à partir d'une solution d'HCl (acide chlorhydrique). A partir de cette solution, le  $^{68}\text{Ga}$  était facilement récupérable (184). L'ensemble de ces techniques donnait de bons résultats de rendement et une faible contamination par le Ge. Le Ga était sous forme d'ion libre utilisable pour un possible marquage. Cependant, elles n'étaient pas transposables en clinique. En effet, la plupart des solvants d'extraction employés sont considérés comme toxiques et donc interdits chez l'homme. De plus, les volumes nécessaires pour la production d'une activité suffisante de  $^{68}\text{Ga}$  étaient beaucoup trop importants pour le radiomarquage.

En 2011, Shehata et al. proposent un nouveau solvant, l'Aliquat 336 (chlorure de tri-octyl-méthyl-ammonium) dans l'o-xylène (185). Le rendement de purification par cette technique est de plus de 95 %. Malheureusement, le  $^{68}\text{Ga}$  est sous la forme d'hydroxyde qui est inutilisable pour un marquage. Actuellement la technique d'extraction liquide-liquide n'est pas retenue et cette voie semble être abandonnée par les radiochimistes.

Pour répondre au problème de l'utilisation clinique du  $^{68}\text{Ga}$ , des générateurs basés sur la chromatographie d'échange d'ions ont été proposés. Le principe repose sur l'utilisation d'une phase stationnaire constituée de macromolécules formant un solide poreux insoluble dans les solvants d'élution et ayant la propriété de pouvoir échanger des ions avec la phase mobile. Les colonnes développées pour la production de générateurs  $^{68}\text{Ge}$  /  $^{68}\text{Ga}$  sont constituées de matrices échangeuses de cations. Elles ont comme propriété principale de retenir sélectivement le  $^{68}\text{Ge}$  tout en facilitant l'élution du  $^{68}\text{Ga}$ .

### I.C.1 Les principes généraux de l'échange d'ions

La réaction d'échange ionique est réversible. Il s'agit donc d'un équilibre. Il s'observe une compétition entre les deux ions A en solution et B fixé à la résine. La réaction s'écrit :



$A_s / B_s$  : ion A ou B en solution

$A_r / B_r$  : ion A ou B sur la résine

D'après la loi d'action de masse, la constante d'équilibre de la réaction s'exprimera par

$$K_B^A = \frac{[A]_r^b [B]_s^a}{[A]_s^b [B]_r^a}$$

Les crochets représentent la concentration des ions en mol / L en solution et en mol / Kg pour la résine.

Cette constante est également appelée coefficient de sélectivité de la résine ou facteur de séparation entre deux ions (186). Plus sa valeur augmente, plus la séparation entre les ions est bonne et l'affinité de la résine pour un ion est élevée. La sélectivité de la résine est essentiellement influencée par la charge ionique de l'ion à retenir et sa nature.

Différents facteurs interviennent sur la réaction d'équilibre (187) :

- La composition ionique de la résine : il s'agit de la nature de la résine et du type de fonctions ionisées qui la composent (ex :  $-\text{SO}_3^-$ ).
- L'affinité de l'ion : si l'affinité de la résine pour A en solution est supérieure à celle de la résine pour B qui est fixé, l'équilibre est en faveur d'un échange des ions au niveau de la résine et inversement.
- La force ionique de la solution : en réalité, la constante d'équilibre s'exprime avec les coefficients d'activité de chaque ion. Cependant, ceux-ci sont difficilement mesurables sur une résine échangeuse d'ions. Les constantes sont usuellement assimilées aux concentrations en ions.
- Le pH: il influe sur la capacité d'échange de la résine qui correspond au nombre d'ions échangeables par la résine en conditions données.
- La température à laquelle aura lieu la réaction.

## **Production du $^{68}\text{Ga}$ – Le générateur de $^{68}\text{Ge}$ / $^{68}\text{Ga}$ – Les matrices**

Ces facteurs influencent le comportement de l'ion pour sa matrice. Dans le cas d'un générateur, ils dictent les caractéristiques nécessaires à la sélection d'une bonne matrice de fixation pour un radionucléide donné.

### **I.C.2 Les matrices**

Les matrices fixant le  $^{68}\text{Ge}$  doivent posséder différentes caractéristiques : elles doivent être sélectives, être résistantes à l'irradiation produite par le radionucléide (aussi appelé phénomène de radiolyse) et posséder une stabilité vis-à-vis des solutions acides qui sont les plus utilisés pour l'élution du  $^{68}\text{Ga}$  (188,189).

Le marquage implique que le  $^{68}\text{Ga}$  soit élué sous une forme réactive (l'ion  $\text{Ga}^{3+}$ ) avec une très bonne pureté radiochimique et radionucléidique. Pour cela durant l'élution, les matrices ne doivent pas rejeter de contaminants constitutifs ou adsorbés.

#### **I.C.2.a Les matrices inorganiques**

La première matrice proposée était inorganique et constituée d'oxyde d'aluminium ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) (180). Le  $^{68}\text{Ga}$  était élué par l'EDTA (acide éthylène-diamine-tétraacétique) à 5mM à pH 7 formant un complexe  $^{68}\text{Ga}(\text{EDTA})^-$ . Le rendement de marquage était de 70% mais les auteurs observaient une diminution dramatique du marquage avec le vieillissement du générateur. L'explication avancée était une augmentation des contaminants métalliques notamment d' $\text{Al}^{3+}$  qui rentrait en compétition avec le  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  et réduisait les rendements. Sur ce même principe, une matrice d'oxyde de zirconium a également été développée (190). L'élution était réalisée par l'EDTA et les auteurs utilisaient directement le complexe pour produire des images. Le remplacement de la matrice par une matrice d'oxyde d'antimoine ( $\text{Sb}_2\text{O}_5$ ) permit une stabilisation de la matrice dans le temps et une fixation du rendement à 80% (191). Le solvant d'élution était composé d'oxalates. L'éluat était composé de complexes de  $^{68}\text{Ga}$ . Une étape supplémentaire était donc nécessaire pour libérer l'ion  $\text{Ga}^{3+}$  avant sa complexation avec d'autres molécules d'intérêt thérapeutique. Au-delà de la perte d'activité durant la manipulation, ce passage obligatoire augmentait drastiquement le temps de synthèse diminuant ainsi les possibilités de radiomarquage (192,193).

Afin d'obtenir du  $^{68}\text{Ga}$  sous forme ionique, Kopecky et al. comparent à différents pH d'élution des matrices d'oxyde de fer et d'aluminium acide, neutre et basique (192). Les

### **Production du $^{68}\text{Ga}$ – Le générateur de $^{68}\text{Ge}$ / $^{68}\text{Ga}$ – Les matrices**

résultats indiquent que l'oxyde d'aluminium basique est la matrice la plus intéressante et qu'en milieu acide, une élution avec une solution d'HCl à 0,2 M est la plus adaptée pour l'élution du  $^{68}\text{Ga}$  sous forme ionique. En-deçà d'un pH inférieur à 1,5 les auteurs démontrent que cette diminution influe peu sur le rendement d'élution alors que la concentration en contaminants est très augmentée. L'utilisation d'HCl est confirmée par Loc'h et al. qui propose l'élution d'une colonne d'oxyde d'étain ( $\text{SnO}_2$ ) par l'HCl 1 M. Le rendement d'élution est de 78 % avec un taux de  $^{68}\text{Ge}$  de  $2.10^{-4}$  % par élution (194). Plus récemment, Asti et al. ont proposé une étude similaire avec une matrice en oxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ) éluee par de l'HCl 0,1M (195). Les résultats sont similaires à ceux obtenus avec la matrice  $\text{SnO}_2$  bien qu'une fuite du  $^{68}\text{Ge}$  soit observée au cours du temps. Beaucoup d'autres matrices ont été conçues mais les rendements d'élution ou les solvants utilisés étaient inadaptés à la clinique (196–199).

En 2010, Chakravarty et al. proposent deux nouvelles matrices. La première est une matrice de polyacrylonitriles nanocériés (200). L'élution est réalisée en HCl 0,01 M. Le rendement est supérieur à 80 % durant 7 mois. La contamination en  $^{68}\text{Ge}$  est très faible, inférieure à  $1.10^{-5}$  % de l'activité totale éluee et la pureté radiochimique de l'éluat est supérieure à 99,9 %. L'année suivante, la même équipe décrit une matrice de nanoparticules de zirconium (189). Les résultats de pureté et de contamination de l'éluat sont sensiblement identiques. En outre, aucun contaminant issu de la matrice n'a été détecté.

#### **I.C.2.b Les matrices organiques**

L'ion  $\text{Ge}^{4+}$  est connu pour former des complexes stables avec les groupements phénoliques (201). Partant de cette propriété, Schuhmacher et al. produisent une matrice cationique de copolymère de pyrogallol-formaldéhyde (202). L'élution est réalisée en HCl 4,5 M et les rendements varient de 70 % et 80 %. Suite à cet essai, Neirinckx et al. testent la colonne sur 600 éluions et concluent à une bonne stabilité de la matrice ainsi qu'à une bonne résistance de la colonne à l'irradiation (203).

Une autre matrice organique de copolymères macroporeux de styrène-divinylbenzène contenant des groupements *N*-méthylglucamine est décrite par Nakayama et al. en 2003 (204). Les groupements hydrophiles demandent une élution en sel de citrate ou de

phosphate. Cette matrice n'a cependant pas été réutilisée car elle montre une instabilité aux rayonnements  $\gamma$  provoquant la fuite de  $^{68}\text{Ge}$  au cours du temps.

### I.C.3 Les générateurs commercialisés

Plusieurs générateurs sont aujourd'hui commercialisés. Les caractéristiques générales de chacun sont présentées dans le tableau 7.

	Cyclotron Co Ltd, Obninsk (195)	Eckert and Ziegler (205)	iThemba (206)	Isotope Technologies Garching (ITG) GmbH (207)
<b>Origine</b>	Russie	Etats-Unis	Afrique du Sud	Allemagne
<b>Matrice</b>	$\text{TiO}_2$	$\text{TiO}_2$	$\text{SnO}_2$	pyrogallol
<b>Solvant d'éluion</b>	HCl 0,1 M	HCl 0,1 M	HCl 0,6 M	HCl 0,05 M
<b>Rendement d'éluion %</b>	70-80	> 70	75	80
<b>% de <math>^{68}\text{Ge}</math> de l'activité<sup>(a)</sup></b>	<0,01	<0,0001	< 0,01	<0,005

**Tableau 7. Caractéristiques principales des générateurs commercialisés**

(a) Pourcentage évalué uniquement à la mise en place du générateur

#### I.C.3.a Le générateur d'Obninsk avec une matrice $\text{TiO}_2$

Le premier générateur commercialisé est produit par le cyclotron d'Obninsk. Sa matrice est en  $\text{TiO}_2$  et l'éluion est réalisée avec 6 mL par du HCl 0,1 M. En 2005, ce générateur est testé par l'équipe de Breeman et al (208). L'éluion a un rendement de 90 % mais après 8 mois le rendement diminue à 60 %. Les auteurs émettent l'hypothèse que cette chute est liée à l'instabilité de la matrice au cours du temps avec une augmentation de l'affinité pour le  $^{68}\text{Ga}$ . Pour eux, le pourcentage de  $^{68}\text{Ge}$  présent dans les éluats est stable à 0,002 % de

### **Production du $^{68}\text{Ga}$ – Le générateur de $^{68}\text{Ge}$ / $^{68}\text{Ga}$ – Les générateurs commercialisés**

l'activité totale éluee. En 2008, l'équipe de Asti et al. montre l'augmentation importante de la fuite de  $^{68}\text{Ge}$  au fur et à mesure du temps pour le générateur d'Obninsk (195). L'augmentation est estimée à 15 % de  $^{68}\text{Ge}$  de plus par mois passant de 0,01 % à 0,026 % de l'activité totale éluee. Elle est liée à la perte de rendement observée par les auteurs passant de 82 % à 69 % en 7 mois. Cette dernière étudie tempère les résultats obtenus par Breeman et al.

#### **I.C.3.b *Le générateur de Eckert et Ziegler avec une matrice $\text{TiO}_2$***

Le générateur commercialisé par Eckert et Ziegler est présenté par Ocak et al. en 2010 (205). Ce générateur possède également une colonne avec une matrice en  $\text{TiO}_2$  et est élué par de l'HCl 0,1 M. Les essais réalisés sur différents volumes d'élution montrent que les rendements restent identiques à 73 % entre 5 mL et 10 mL. La mesure du  $^{68}\text{Ge}$ , 48h après l'élution, est inférieure à 0,0001 % lors de la mise en place du générateur. Actuellement, il s'agit de la seule publication présentant les caractéristiques de ce générateur. Sa comparaison avec le générateur d'Obninsk serait intéressante notamment en terme de stabilité de la matrice qui semble meilleure pour celle du générateur de Eckert et Ziegler.

#### **I.C.3.c *Le générateur de IThemba avec une matrice $\text{SnO}_2$***

Après les travaux réalisés dans les années 70 et 80, Aardanesh et al. reprennent les recherches sur la matrice  $\text{SnO}_2$  (209). Ils comparent différentes synthèses de la matrice. Après calcination du  $\text{SnO}_2$  à  $900^\circ\text{C}$ , la diminution de la taille des pores diminue la fuite de  $^{68}\text{Ge}$  et augmente le rendement d'élution. En 2011, le premier générateur commercialisé par IThemba est caractérisé par l'équipe de De Blois et al. Les éluions sont réalisées en gradient de concentration d'HCl de 0,3 à 1 M. L'optimisation donne un rendement d'élution de 75 % pour une concentration en HCl de 0,6 M. Après 300 j, l'élution est pratiquement identique et la perte en activité est faible. De plus, le pourcentage de  $^{68}\text{Ge}$  dans l'éluat reste stable après 9 mois d'utilisation à 0,01 % de l'activité totale en  $^{68}\text{Ga}$ .

#### **I.C.3.d *Le générateur de ITG avec une matrice pyrogallol***

Le dernier générateur commercialisé est celui de ITG. Il utilise les travaux réalisés sur la matrice organique pyrogallol-formaldéhyde et *N*-méthylglutamine (202,204). Zhernosekov

**Production du  $^{68}\text{Ga}$  – Le générateur de  $^{68}\text{Ge}$  /  $^{68}\text{Ga}$  – Les générateurs commercialisés**

présente au congrès de l'EANM (*European Association of Nuclear Medicine*) en 2010 le principe de cette colonne (207). Il s'agit d'une résine portant des fonctions pyrogallol fixées grâce au dodécyl-3,4,5-trihydroxybenzoate, insoluble dans l'eau, sur un support inerte. L'élution est réalisée en HCl 0,05 M. Le rendement d'élution est de 80 %. Sur un an, la contamination en  $^{68}\text{Ge}$  oscille entre 0,0004 % et 0,003 % de l'activité éluee. Ce nouveau générateur a la particularité d'être stérilisable. Très récemment, une première publication de marquage d'analogues de la somatostatine avec ce générateur montre que le pourcentage en  $^{68}\text{Ge}$  reste inférieur à 0,001 % de l'activité totale en  $^{68}\text{Ga}$  (210).

Le générateur le plus utilisé à l'heure actuelle est celui de Eckert et Ziegler car il possède une certification de production selon les bonnes pratiques de fabrications, indispensable pour une utilisation clinique. Les générateurs de IThemba et de ITG sont également en cours de certification. La qualité du générateur repose en majorité sur la pureté de l'éluat produit. Pour le moment, aucune comparaison entre les générateurs n'a été réalisée. Ces études seraient intéressantes dans le cadre de recherches précliniques afin d'améliorer les rendements de radiomarquage et en clinique pour le choix du générateur à utiliser.

## II Les chélatants du $^{68}\text{Ga}$

### II.A Propriétés chimiques du $^{68}\text{Ga}$

Le gallium est un métal de post-transition du groupe 13. Il a été découvert en 1874 par Lecoq de Boisbaudran en spectrométrie grâce à ses deux raies principales situées dans le violet. Il s'agit d'un métal liquide à température proche de la température ambiante (TA), d'aspect argenté. Sa température de fusion est de  $29,8^\circ\text{C}$ . Sa masse atomique est de  $69,72\text{ g/mol}$  (211). Le Ga est un élément amphotère. Selon le pH, son comportement sera celui d'un acide ou d'une base.

En solution aqueuse, seul le degré d'oxydation (+III) est stable. Cependant, la forme ionique  $\text{Ga}^{3+}$  n'est stable qu'en milieu très acide inférieur à pH 3. Aux pH de 3 à 7, le Ga s'hydrolyse sous forme d'hydroxydes de type  $\text{Ga}(\text{OH})_3$  insolubles selon la réaction :



En milieu basique, l'hydroxyde de Ga se solubilise formant l'ion gallate  $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ , au sein duquel le gallium n'est pas disponible pour une éventuelle complexation par un ligand. Dans le cas de l'utilisation du générateur de  $^{68}\text{Ge} / ^{68}\text{Ga}$ , le Ga est élué par de l'HCl. Dans ce milieu très acide et possédant une forte concentration en ions  $\text{Cl}^-$ , il est sous la forme  $^{68}\text{GaCl}_4^-$ . Cette forme est soluble et permet le radiomarquage du  $^{68}\text{Ga}$  avec des chélatants.

### II.B Propriétés biologiques du $^{68}\text{Ga}$

La connaissance du comportement *in vivo* du  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  libre est indispensable lors de l'évaluation de traceurs. Dans le cas de l'imagerie nucléaire, le  $^{68}\text{Ga}$  est injecté chez l'homme à l'état de trace (de l'ordre de la pmol de Ga). Il est donc considéré comme non toxique à cette concentration. Sa distribution à l'état libre concerne essentiellement les hydroxo-complexes du fait du pH sanguin neutre. La taille des colloïdes de  $^{68}\text{Ga}$  limite leur passage pulmonaire et entraîne leur accumulation importante dans les poumons. De ce fait, une indication clinique proposée pour les colloïdes est l'évaluation de la ventilation pulmonaire sous la forme d'aérosol, le Galligas (257). Concernant la biodistribution du  $^{68}\text{Ga}$  *in vivo*, peu

## **Les chélatants du $^{68}\text{Ga}$ – Rappels généraux sur la chimie de complexation – La théorie HSAB**

de données sont actuellement disponibles. Cependant celle-ci peut être comparée aux données de biodistribution du  $^{67}\text{Ga}$  et notamment du citrate de  $^{67}\text{Ga}$  (Covidien®) (212). Ce médicament radiopharmaceutique est indiqué dans la localisation non spécifique de tumeurs et dans la localisation de lésions inflammatoires. Après injection de citrate de  $^{67}\text{Ga}$ , celui-ci est pris en charge par les protéines du transport sanguin du fer notamment la transferrine, la lactoferrine ou la ferritine qui rejoignent le foie pour son stockage et les réticulocytes pour la production des hématies. Une forte proportion de Ga est retrouvée dans le foie (10%) et le système reticulo-endoplasmique notamment la rate (1%). La forte affinité du Ga pour l'hydroxy-apatite le conduit également à une très forte accumulation osseuse (30%). En conditions pathologiques, l'accumulation du Ga au niveau des sites inflammatoires est directement liée à sa distribution par les protéines plasmatiques. L'excrétion du  $\text{Ga}^{3+}$  est essentiellement urinaire à plus de 90%. Elle s'accompagne d'une lente élimination fécale (213).

## **II.C Rappels généraux sur la chimie de complexation**

### **II.C.1 La théorie HSAB**

L'affinité d'un atome donneur pour un ion métallique peut être rationalisée par la théorie HSAB (*Hard and Soft Acids and Bases*) développée par Pearson dans les années 60 (214). Cette théorie aborde qualitativement la sélectivité des réactions de complexation. La notion d'acide et de base fait référence à la classification de Lewis où l'interaction entre un métal et un ligand peut être assimilée à un équilibre acide-base. Un acide de Lewis est une espèce électrophile ou acceptrice d'électrons alors qu'une base de Lewis est une espèce donneuse d'électrons. Selon la théorie HSAB, les ions et les groupes fonctionnels peuvent être classés selon 2 catégories : les mous et les durs. Un acide dur est un atome accepteur d'électrons ayant une charge positive élevée, de petite taille et possédant un fort pouvoir polarisant. Une base dure est un atome donneur d'électrons de forte électronégativité, difficilement oxydable et difficilement polarisable. A l'inverse, un acide mou est un accepteur d'électrons ayant une charge positive faible, une grande taille et un pouvoir polarisant faible. Une base molle est un donneur d'électrons de faible électronégativité, facilement oxydable, hautement polarisable. La dureté d'une espèce étant graduelle, de

**Les chélatants du  $^{68}\text{Ga}$  – Rappels généraux sur la chimie de complexation – La stabilité des complexes**

nombreux atomes ne rentrent pas dans ces définitions au sens strict et sont considérés comme des acides ou des bases intermédiaires. Le principe d'interaction entre ces différentes espèces est cependant clairement établi (215). Un acide dur va préférentiellement se coordonner avec une base dure et un acide mou avec une base molle. Les liaisons que forment ces complexes sont une composante plutôt électrostatique pour les durs et une composante plutôt covalente pour les mous.

**II.C.2 La stabilité des complexes**

La stabilité des complexes est mesurée par une grandeur thermodynamique notée  $\beta$  qui reflète l'équilibre chimique des espèces en solution dans le système de complexation (216). Dans le cas du  $^{68}\text{Ga}$ , la réaction de complexation s'écrit :



La constante d'équilibre s'écrit  $\beta = \frac{[\text{Ga}(\text{L})_x]}{(\text{Ga}^{3+})(\text{L})^x}$  (1)

Cependant, cette expression de l'équilibre ne suffit pas à caractériser la réalité. En effet, les ligands (L) sont des bases de Lewis et à ce titre, elles sont en permanence susceptibles de se protoner ou de se déprotoner (comme  $-\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{SH}\dots$ ) en solution aqueuse :



La constante d'équilibre s'écrit  $\text{pKa} = -\log \text{Ka}$  où  $\text{Ka} = \frac{(\text{L}^-)(\text{H}^+)}{(\text{LH})}$  (2)

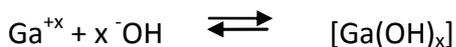
Ces réactions de protonation d'un ligand entrent en compétition avec celle de complexation. En tenant compte des équilibres (1) et (2), une définition plus réaliste des équilibres en solution conduit à calculer le pM qui représente la quantité de métal résiduelle après complexation. Elle représente donc l'efficacité de complexation du ligand.

**Les chélatants du  $^{68}\text{Ga}$  – Rappels généraux sur la chimie de complexation – La stabilité des complexes**

Elle s'écrit 
$$pM = -\log[M] \quad (3)$$

Où (M) reflète la concentration résiduelle de l'ion métallique libre après complexation dans un milieu donné (ici à pH physiologique et pour une concentration en métal total fixée). Cette grandeur intègre donc la constante de stabilité du complexe ainsi que les pKa des ligands, c'est à dire leur tendance à la protonation. Elle permet de comparer directement l'affinité de différents ligands vis-à-vis des métaux, en s'affranchissant du nombre de groupes donneurs présents sur le ligand (denticité) ainsi que de leur pKa. Plus la valeur de pM est élevée, plus le ligand est affin (217).

A noter également qu'en milieu aqueux pour un pH physiologique, la réaction de complexation est aussi en concurrence avec la réaction d'hydrolyse des cations métalliques. Les hydroxydes métalliques sont très peu solubles dans l'eau et tendent à former des colloïdes inertes.



La valeur de pM intègre également l'équilibre de la réaction d'hydrolyse puisque pour le calculer, il faut tenir compte de l'ensemble des équilibres chimiques où le métal est présent.

De plus, la stabilité du complexe doit prendre en compte l'effet chélate décrit pour la première fois par Schwarzenbach (218). Cet effet stabilisant résulte de la formation de cycles au sein de la sphère de coordination. Ainsi, l'augmentation progressive du nombre de cycles chélates au sein du complexe induit un accroissement des constantes de stabilité pour l'ion métallique considéré. Pour des ligands ayant des cycles chélates identiques, le nombre d'atomes engagés dans chaque cycle et le rayon ionique du cation métallique contribuent également à la stabilité du complexe. Bien qu'il soit établi que la taille d'un cycle va modifier la stabilité du complexe et que plus le cycle est grand moins le complexe est stable, Martell et Hancock ont montré que les contraintes stériques au sein d'un cycle déterminent pour une large part sa stabilité (219). Ainsi, selon l'angle de liaison et la distance entre le métal et l'atome donneur, la géométrie idéale du complexe sera favorable à des cycles de tailles différentes. Pour le  $\text{Ga}^{3+}$ , la géométrie idéale pour un cycle de 6 atomes est obtenue pour une distance de 1,6 Å et un angle de 109,5° alors que l'énergie de contrainte d'un cycle à

### **Les chélatants du $^{68}\text{Ga}$ – Rappels généraux sur la chimie de complexation – L'inertie cinétique des complexes**

cinq atomes sera minimale pour une distance de liaison de 2,5 Å et un angle voisin de 70° que seuls les ions volumineux peuvent satisfaire.

#### **II.C.3 L'inertie cinétique des complexes**

La stabilité du complexe n'est pas la seule grandeur à considérer lors des réactions de radiomarquage. En effet, malgré une stabilité de complexation moyenne, certains chélatants ont une cinétique de complexation et de décomplexation lente. Il s'agit de la notion d'inertie cinétique. Cette notion est étroitement corrélée à celle de la labilité des cations où la cinétique d'échange d'un ligand eau exogène est examinée avec l'eau déjà coordonnée au centre métallique. Plus l'inertie cinétique est élevée, plus la réaction de radiométallation sera lente. Dans le cas du  $^{68}\text{Ga}$ , celle-ci n'est pas favorable du fait de la courte période physique du radionucléide. Cependant, l'inertie cinétique peut se révéler essentielle pour limiter sa décomplexation *in vivo*. Ainsi en imagerie, un complexe possédant une stabilité thermodynamique modérée mais une inertie cinétique élevée pourra être employé si la biodistribution du vecteur considéré est plus rapide que la décomplexation du métal. Dans ce cas, le traceur sera utilisable en imagerie. L'un des exemples majeur est l'utilisation des complexes du  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  de degré d'oxydation (+I) qui sont réputés cinétiquement inertes et qui sont pourtant utilisés dans la formation du Sestamibi.

Un compromis entre une complexation rapide et une décomplexation lente est donc souvent recherché. Pour accroître la cinétique de complexation, des techniques de chauffage permettent d'améliorer la vitesse de réaction (220,221). Récemment, une technique plus originale mettant en jeu des conditions anhydres a été proposée (222). Elle permet la complexation de radiométaux avec des molécules thermolabiles qui seraient dégradées par un chauffage trop élevé.

## **II.D Les chélatants bifonctionnels**

### **II.D.1 Les caractéristiques générales**

Un chélatant, dont qui vient du grec « chélé » qui signifie « pince », est une molécule dont le rôle principal est de capter un métal par complexation en formant un cycle avec celui-ci. Ainsi, les chélatants sont à minima bi-dentates voire polydentates. Les chélatants polydentés doivent former des complexes plus stables que leurs analogues monodentates. Pour les applications en Médecine Nucléaire, le complexe est le plus souvent véhiculé par une molécule vectrice. Le chélatant sera donc conjugué au vecteur par une liaison covalente, directement ou grâce à l'ajout d'un groupement de liaison appelé groupe d'ancrage. Dans ce dernier cas, on parle de synthon bifonctionnel ou de chélatant bifonctionnel. Un bon chélatant bifonctionnel (CBF) doit :

- Former un complexe stable lors du marquage et présenter une inertie vis-à-vis des molécules *in vivo*,
- Complexer rapidement surtout pour les radionucléides à période courte,
- être le plus sélectif possible pour le métal à complexer afin d'obtenir une haute AS,
- avoir une chimie de conjugaison souple, c'est-à-dire ayant une flexibilité dans les conditions de conjugaison pour différents vecteurs,
- être accessible et donc peu coûteux, simple à mettre en œuvre et surtout pouvoir être produit à l'échelle industrielle.

Les CBF ne peuvent cependant pas remplir toutes ces conditions. Principalement, l'élaboration d'un traceur marqué au  $^{68}\text{Ga}$  devra tenir compte de la similitude de comportement chimique entre le  $\text{Ga}^{3+}$  et le  $\text{Fe}^{3+}$  (même charge et rayon ionique similaire). En effet, la plupart des molécules chélatant le  $^{68}\text{Ga}$  sont susceptibles de fixer également le fer. Cette caractéristique est à l'origine de la démétallation souvent observée lors de l'administration des complexes de  $^{68}\text{Ga}$  de faible constante de stabilité (223). La mise au point de nouveaux chélatants bifonctionnels du  $^{68}\text{Ga}$  s'est donc orientée vers la préparation d'espèces possédant une importante stabilité thermodynamique pour prémunir les réactions de décomplexation dues essentiellement à la transferrine, molécule la plus souvent incriminée dans ce processus. De ce fait, la transferrine a longtemps servi de référence pour comparer les chélatants entre eux. Aujourd'hui, l'utilisation de la transferrine

### **Les chélatants du $^{68}\text{Ga}$ – Les chélatants bifonctionnels – Caractéristiques générales**

comme référence n'apparaît plus pertinente car de nombreux CBF possèdent des constantes de stabilité bien supérieures. D'autre part, les CBF ne sont pas inertes. Ils modifient les caractéristiques chimiques du vecteur et donc ses paramètres pharmacodynamiques *in vivo*. Leur taille et leur charge peuvent modifier l'affinité d'un ligand pour son récepteur ; leur lipophilie perturbe l'élimination des traceurs.

Le  $^{68}\text{Ga}$  étant un émetteur de courte période, il est difficile techniquement de réaliser le radiomarquage du CBF puis de lier le complexe au vecteur. La seule technique est donc de modifier le vecteur pour qu'il puisse être radiomarké par le  $^{68}\text{Ga}$  dans un deuxième temps. La technique de modification du vecteur par un CBF est appelée la conjugaison. Plusieurs techniques ont été proposées selon le type de CBF et le type de vecteur.

#### **II.D.2 Les techniques de conjugaison des CBF**

La conjugaison du CBF avec un vecteur nécessite que le chélatant possède un groupe d'ancrage réactif pour des fonctions présentes sur le vecteur. Celles visées peuvent être distinguées en fonction de leur réactivité :

- soit modérée à pH physiologique mais présentes en assez grand nombre, comme les amines des résidus lysine des protéines,

- soit élevée mais en faible nombre, comme les fonctions thiols des résidus cystéines ou les fonctions phénols des résidus tyrosines.

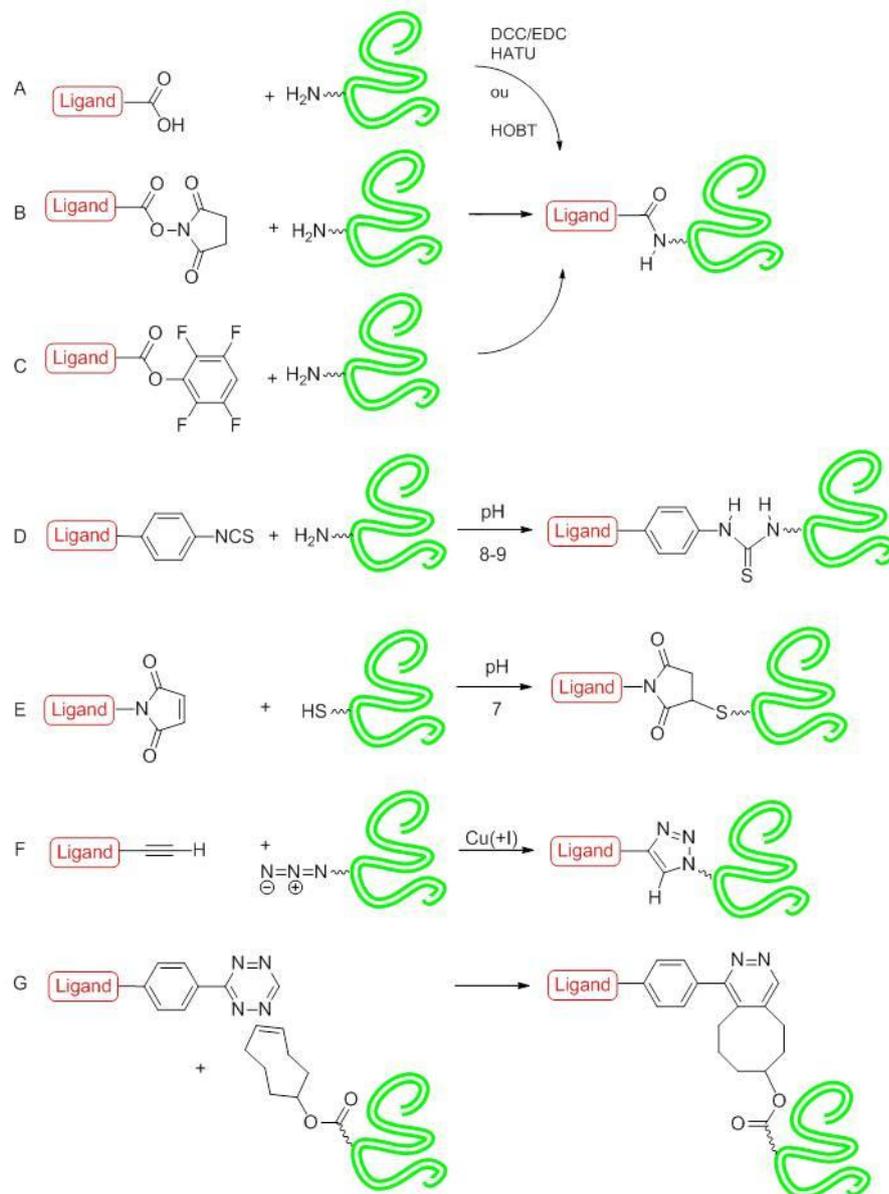
Il est également possible d'insérer synthétiquement cette fonction sur le vecteur.

Le plus souvent, les réactions de couplage se font sur les fonctions réactives hydroxyles des alcools ou des phénols, thiols, acides carboxyliques et surtout amines des peptides.

Le groupe d'ancrage est alors choisi pour réagir avec ces fonctions mais il doit être stable vis-à-vis des groupes complexants de la partie chélatante, ce qui limite le nombre de possibilités. Les groupes d'ancrage les plus souvent décrits dans la littérature sont : les esters activés par des groupements *N*-hydroxysuccinimide (NHS) ou tétrafluorophénol (TFP), les isothiocyanates (NCS), les maléimides, les azotures et les tétrazides.

Les réactions de conjugaisons les plus courantes utilisant ces groupements sont présentées dans la fig. 24 (224)

**Les chélatants du  $^{68}\text{Ga}$  – Les chélatants bifonctionnels – Techniques de conjugaison**



**Figure 24. Réactions de conjugaison courantes entre un CBF et un vecteur**

La première technique (fig 24. A) permet la formation de liaisons amines en synthèse peptidique et nécessite l'utilisation de réactifs organiques. Peu sélective, elle peut être problématique pour la conjugaison de protéines ayant une structure complexe comme les Ac.

Les esters activés (fig 24. B et C) possèdent une réactivité intermédiaire pour les amines et une grande sélectivité pour les amines aliphatiques. Tous les acides carboxyliques peuvent normalement être convertis en leurs esters ce qui rend cette technique attractive

### **Les chélatants du $^{68}\text{Ga}$ – Les chélatants bifonctionnels – Techniques de conjugaison**

notamment pour la fonctionnalisation de chélatants possédant des fonctions carboxyliques (225,226). Les réactions de conjugaison sont réalisées à pH basique en milieu aqueux. La technique est simple et des chélatants commerciaux fonctionnalisés par des esters sont aujourd'hui disponibles.

Les isothiocyanates SCN (fig 24. D) possèdent également une réactivité intermédiaire pour les amines et forment des liaisons thiourées avec les amines primaires des peptides. Leur principal inconvénient est que la réaction de conjugaison demande un pH alcalin situé à 9 – 9,5 ce qui la rend inutilisable avec des vecteurs sensibles à ces pH. Les SCN aromatiques sont souvent proposés pour fonctionnaliser les chélatants car ils sont assez facilement engendrés et stables (227,228).

Les maléimides (fig 24. E) sont des groupements réactifs pour les thiols et forment des liaisons thioéthers stables *in vivo*. La réaction est réalisable à un pH physiologique ce qui est un avantage. Cependant, de nombreuses molécules ne possèdent pas de fonctions thiols apportées la plupart du temps par les cystéines des chaînes aminées. Cette technique bien que très sélective est donc peu utilisée si l'ajout de fonction thiol sur du vecteur n'est pas envisagé.

Les azotures et les tétrazides (fig 24. F et G) sont des groupements intéressants car les réactions de conjugaison sont extrêmement sélectives. Les principes de ces méthodes de conjugaison utilisant la chimie bio-orthogonale rejoignent ceux présentés au chapitre 1 et ne seront pas redétaillés. Il est important de noter que ces deux techniques réclament également la modification du vecteur par l'ajout de fonctions réactives de types alcynes et diènes, ce qui peut être un frein à leur utilisation.

Le site de conjugaison du vecteur peut être proche de son site actif de ciblage. Afin de limiter les réactions indésirables et de conserver la fonction biologique du vecteur, des espaceurs peuvent être ajoutés. Les plus connus sont les poly(éthylène glycol) ou les chaînes hydrocarbonées (229). Les caractéristiques chimiques de ces espaceurs peuvent néanmoins modifier les propriétés pharmacocinétiques des traceurs notamment leur lipophilie et leur charge. C'est essentiellement le cas pour les peptides de faible poids moléculaires et souvent hydrophiles.

### **Les chélatants du $^{68}\text{Ga}$ – Les chélatants bifonctionnels – Les chélatants macrocycliques**

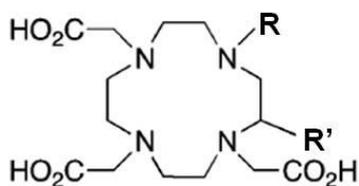
Aujourd'hui, la grande majorité des vecteurs proposés pour l'imagerie au  $^{68}\text{Ga}$  sont conjugués avec des CBF macrocycliques mais une autre approche concerne le développement de molécules acycliques plus faciles à synthétiser.

#### **II.D.3 Les chélatants macrocycliques**

Le Ga présente une chimie de coordination ayant beaucoup de similitudes avec celle de l'indium. Selon la théorie HSAB, le  $\text{Ga}^{3+}$  est un acide de Lewis dur du fait de son faible rayon ionique et de sa forte charge. Il s'hydrolyse donc facilement dans l'eau dès un pH acide ( $\text{pK}_a = 2,6$ ). Cette dureté de l'état d'oxydation (+III) conduit le gallium à se coordonner avec des espèces donneuses riches en électrons comme les ligands contenant des donneurs azotés, oxygénés et dans une moindre mesure soufrés tels que les groupements carboxylates, phosphonates, hydroxamates, amines, thiolates ou phénolates (230). Le Ga forme avec ces molécules des complexes dans lesquels le métal présente le plus souvent la coordinence de 6 et plus rarement de 4 ou de 5 (217). De ce fait, la plupart des chélatants du Ga sont hexadentés et se lient au cation selon une géométrie pseudo-octaédrique.

Les poly-aza-macrocycles font partie des ligands les plus étudiés à l'heure actuelle. Issus principalement du TACN (1,4,7-triazacyclononane) et du cyclène (1,4,7,10-tétraazacyclododécane), ces dérivés ont une très bonne inertie cinétique et réduisent les phénomènes de transchélation ou de démétallation *in vivo*. L'effet macrocyclique est à la base de ces propriétés puisque la pré-organisation des sites de complexation de ces chélatants limite la perte d'énergie entropique. Pour augmenter leur denticité pour le Ga, des atomes donneurs ont été additionnés sur des « bras » greffés aux amines secondaires de la couronne. Leur rôle est de saturer la sphère de coordination du Ga à 6 pour stabiliser le radiomarquage tout en offrant éventuellement des sites de fonctionnalisation additionnels utiles pour la conjugaison.

## II.D.3.a Le DOTA et ses dérivés



Molécules	Fonction
DOTA	R=CH <sub>2</sub> COOH, R'=H
DOTA-NHS-ester	R=CH <sub>2</sub> COO-NHS, R'=H
C-DOTA	R= CH <sub>2</sub> COOH, R'= CH <sub>2</sub> -Ph-NCS
DOTAGA	R=C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> (COOH)COO-NHS, R'=H

Figure 25. Représentation schématique des dérivés du DOTA

Dérivé du cyclène, le DOTA (l'acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-*N,N',N'',N'''*-tétraacétique) est le plus commun des chélatants du Ga (231). La plupart des vecteurs en essai sont conjugués au DOTA (fig. 25) (232,233). Son principal intérêt est la présence de 4 bras carboxyliques qui lui permettent d'avoir une coordination maximale de 8 utile surtout pour la complexation des cations métalliques tels que l' $\text{In}^{3+}$  ou les  $\text{Ln}^{3+}$ . Cependant, l'un des groupes carboxyle est souvent transformé en ester activé pour permettre la conjugaison avec le vecteur en établissant une liaison amide très peu, voire pas complexante. Ce faisant, la denticité de la partie chélatante est diminuée, ce qui résulte souvent en une diminution de la stabilité des complexes (226). Pour répondre à cette problématique, de nombreux dérivés du DOTA ont été proposés avec une fonctionnalisation sur le squelette carboné de la molécule (*p*-SCN-Bn-DOTA aussi appelé C-DOTA) ou par la réintroduction d'une fonction de chélation en aval de la conjugaison (ex : le DOTAGA) (234–236). Cependant dans le cas du  $^{68}\text{Ga}$  où la coordination est préférentiellement de 6, seuls deux bras carboxyliques servent à la complexation en association avec le corps  $\text{N}_4$  (237). Les modifications apportées sur le DOTA pour augmenter sa denticité n'auront donc qu'un intérêt limité pour ce radionucléide et serviront essentiellement pour d'autres radiométaux comme le  $^{177}\text{Lu}$  ou le  $^{111}\text{In}$ .

Malgré une stabilité modérée ( $\text{pGa} = 15,2$ ) plus faible que celle de la transferrine ( $\text{pGa} = 19,7$  (223)), il possède une grande inertie cinétique. La réaction de complexation du DOTA sera donc lente. Les protocoles de radiomarquage demandent de chauffer le mélange à plus de  $90^\circ\text{C}$  pour obtenir un rendement de marquage supérieur à 90 % en 10 min. Ceci limite son utilisation à des molécules thermorésistantes comme les peptides ou les haptènes (238).

### Les chélatants du $^{68}\text{Ga}$ – Les chélatants bifonctionnels – Les chélatants macrocycliques

Une étude concernant un dérivé du DOTA, l'oxo-DO3A (acide 1-oxa-4,7,10-triazacyclododecane-4,7,10-triacétique), est présentée par l'équipe de Ferreira en 2010 (239). Dans cette étude, le chélatant seul radiomarqué au  $^{68}\text{Ga}$  est évalué en comparaison avec un C-DOTA. Les conditions de radiomarquage sont largement favorables au dérivé oxo qui possède un rendement de marquage supérieur à 98 % pour une incubation de 5 min à TA alors que le rendement de marquage du C-DOTA est de 9,2% en chauffant à 80°C durant 10 min. Très récemment, ce nouveau chélatant a été testé par Knetsch et al. conjugué à un peptide contenant un motif RGD (asparagine-glycine-acide aspartique) et ciblant l'intégrine  $\alpha\beta_3$  (marqueur de l'angiogénèse tumorale et exprimée par de nombreuses tumeurs) (240). Dans cette étude, les auteurs utilisent des conditions classiques de radiomarquage du DOTA en chauffant le vecteur à 95°C durant 10 min. Le rendement de marquage est supérieur à 95% mais les propriétés radiochimiques intéressantes de ce chélatant ne sont pas ré-exploitées.

#### II.D.3.b Le PCTA

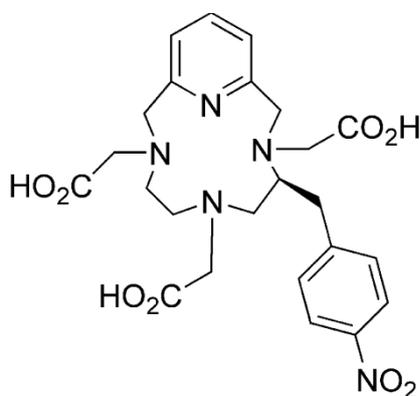
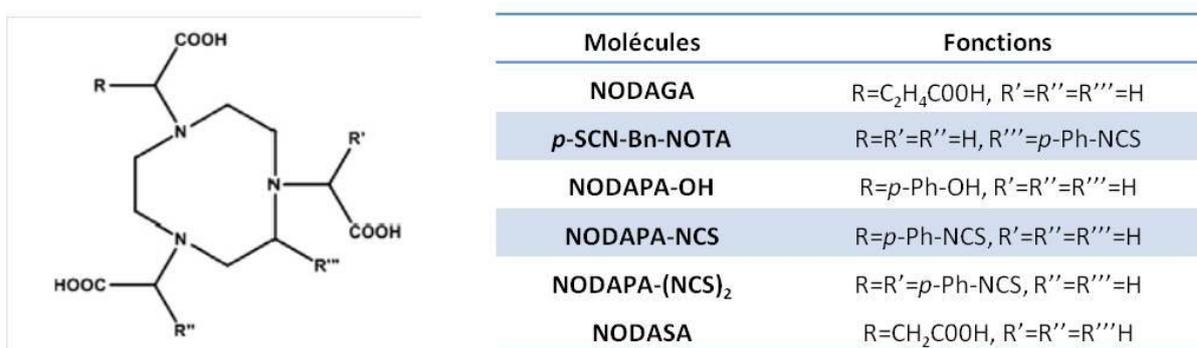


Figure 26. Représentation schématique du PCTA

Ferreira et al. testent également un dérivé macrocyclique heptadenté contenant une pyridine, le PCTA (l'acide 3,6,9,15-tétraazabicyclo[9.3.1]pentadéca-1(15),11,13-triène-3,6,9-triacétique) (fig. 26) (239). Ce chélatant proposé à l'origine pour l'IRM est issu de l'ajout d'une pyrimidine à partir d'un macrocycle dérivé du cyclen comme le DOTA (241). Il possède une constante de stabilité inférieure à celle du DOTA attribuée à sa plus faible basicité ( $\log\beta = 19,37$  vs  $21,3$  pour le DOTA). Les réactions de compétition entre les protons et l'ion  $\text{Ga}^{3+}$  sont également moins importantes pendant le radiomarquage ce qui le rend plus intéressant

**Les chélatants du  $^{68}\text{Ga}$  – Les chélatants bifonctionnels – Les chélatants macrocycliques**

comme chélatant que le DOTA. L'équipe de Ferreira a effectivement montré que ce CBF possède des qualités de radiomarquage supérieures au DOTA puisque le rendement est de 97% pour une incubation à TA et durant 10 min. Bien que moins stable thermodynamiquement, les études de stabilité réalisées *in vitro* et *in vivo* confirment également sa supériorité.

**II.D.3.c Le NOTA et ses dérivés**

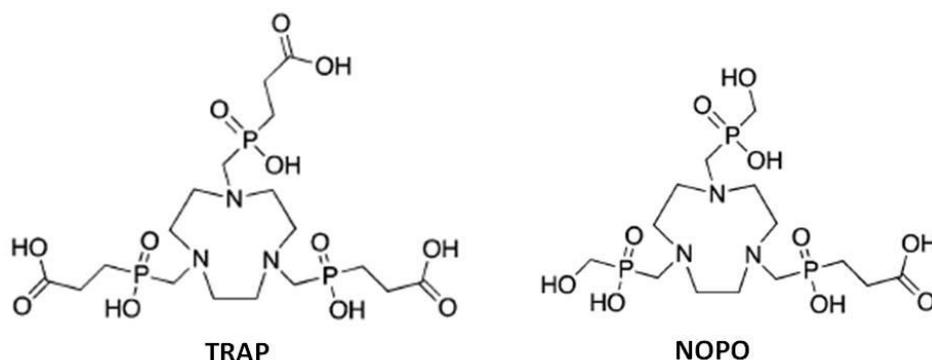
**Figure 27. Représentation schématique des dérivés fonctionnalisés du NOTA**

Le NOTA (acide 1,4,7-triazacyclononane-*N,N',N''*-triacétique), issu du TACN, est un chélatant hexadenté dont le cœur  $\text{N}_3\text{O}_3$  permet une grande stabilité thermodynamique du complexe, liée à la taille du cycle, plus adaptée que celle du DOTA au rayon ionique du  $\text{Ga}^{3+}$ . Malgré sa grande inertie cinétique, la réaction de complexation avec le  $\text{Ga}^{3+}$  serait réalisable à TA avec une durée d'incubation de 10 à 30 min (242). Le pGa du NOTA est de 26,4 ce qui est favorable par rapport à celui de la transferrine (231). La configuration pseudo-octaédrique du NOTA radiomarqué lui confère une charge neutre à pH physiologique. Dans cette configuration, aucun des bras carboxyliques du NOTA n'est disponible pour la fonctionnalisation. Lors de sa liaison directe avec un vecteur *via* l'un des bras carboxylate, la stabilité thermodynamique du complexe est compromise car la coordination de 6 du  $\text{Ga}^{3+}$  n'est plus possible. De plus, la molécule prend une charge positive qui peut modifier les propriétés biologiques du vecteur (236). La difficulté majeure réside dans le fait qu'aucune version commerciale de ce chélatant fonctionnalisé n'existe. Les équipes travaillant avec ce chélatant doivent être capables de le synthétiser. Pour préserver la denticité optimale du

**Les chélatants du  $^{68}\text{Ga}$  – Les chélatants bifonctionnels – Les chélatants macrocycliques**

NOTA, différents dérivés fonctionnalisés sur le carbone ont été proposés pour être conjugués à des peptides (fig. 27). Le plus utilisé à l'heure actuelle est le NODAGA dont la conjugaison est réalisée par une technique de synthèse sur phase solide ou en solution grâce au *N*-ter de la séquence peptidique du vecteur (242,243). Le *C*-NOTA (*p*-SCN-Bn-NOTA), équivalent du *C*-DOTA où la conjugaison est réalisée par l'intermédiaire d'une fonction isothiocyanate, est également proposé pour le radiomarquage de peptides (244). Ces deux CBF possèdent des caractéristiques identiques au NOTA : radiomarquage à TA avec un très bon rendement. Une série de CBF basée sur le NOTA et possédant des acides glutamiques sur les différents bras carboxylés a également été synthétisée. Son intérêt principal est la formation de peptides multivalents (245). Enfin il faut noter la publication de deux autres chélatants : le NODASA, et les dérivés du NODAPA (246,247). Bien que possédant des caractéristiques de complexation intéressantes avec le Ga, aucune application en imagerie n'a été réalisée.

**II.D.3.d Les autres dérivés du TACN**



**Figure 28. Représentations schématiques du TRAP et du NOPO**

Toujours issu du TACN, le TRAP ou PrP9 (acide 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-tris[méthyl(2-carboxyéthyl)phosphinique]) a également été caractérisé avec le Ga par l'équipe de Notni (fig. 28) (248). Sa structure cristalline présente une forme anti-prismatique distordue où l'ion métallique est encapsulé par le corps  $\text{N}_3$  associé au bras déprotoné de l'acide phosphinique. Les « bras carboxyliques » peuvent être fonctionnalisés. Cette structure est moins contraignante que la forme pseudo-octaédrique du NOTA et rend donc favorable la formation du complexe. La force de ce chélatant est sa grande flexibilité

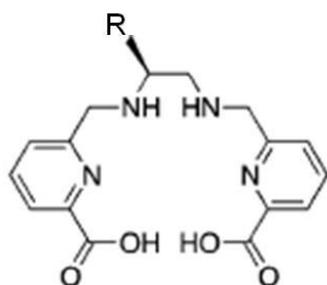
### **Les chélatants du $^{68}\text{Ga}$ – Les chélatants bifonctionnels – Les chélatants macrocycliques**

puisqu'il complexe totalement le  $\text{Ga}^{3+}$  à des pH allant de 1 à 5 et pour des températures inférieures à  $80^\circ\text{C}$ . D'autre part, sa constante de stabilité thermodynamique est grande ( $\log(\beta) = 26,24$ ), dix fois supérieure à celles déterminées pour d'autres ions métalliques comme le  $\text{Zn}^{2+}$  ou le  $\text{Mn}^{2+}$ . Récemment, un dérivé de ce chélatant a été proposé avec un vecteur peptidique RGD. Des groupements éthyl-carboxylates ont été ajoutés pour permettre la formation d'un traceur possédant 3 motifs peptidiques (249). Son radiomarquage est réalisé à  $95^\circ\text{C}$  durant 5 min et à pH 2. La première évaluation préclinique de ce traceur trivalent est encourageante puisqu'il est stable *in vivo* et que son ciblage tumoral a été validé. Cependant, le pourcentage de la dose injectée est également supérieur dans la plupart des organes étudiés. Il paraît donc moins spécifique que les autres traceurs proposés dans la littérature et contraste les bons résultats obtenus.

Le NOPO, semblable au TRAP et proposé par la même équipe, diffère par la présence de fonctions alcools à la place des groupements carboxyliques du TRAP. Conjugué à un peptide dérivé de l'octréotide et indiqué dans les tumeurs neuro-endocrines, son radiomarquage avec le  $^{68}\text{Ga}$  a été réalisé en 2013 (250). Il possède une constante de stabilité thermodynamique de  $\log(\beta) = 25$ , inférieure à celle du TRAP mais son intérêt majeur réside dans son rendement de synthèse supérieur à celui du TRAP (251).

#### **II.D.4 Les chélatants acycliques**

Les chélatants acycliques sont également à l'étude pour le radiomarquage de vecteurs avec le  $^{68}\text{Ga}$ . Leur complexation réclame un changement drastique de leur géométrie afin que les atomes donneurs se coordonnent avec l'ion métallique. A l'inverse des chélatants dérivés des macrocycliques, ils montrent souvent une inertie cinétique plus faible qui provoquerait une démétallation *in vivo*. *A contrario*, cette plus faible inertie se traduit par une réaction de complexation rapide et à RT. Plusieurs chélatants sont aujourd'hui proposés pour le radiomarquage du  $^{68}\text{Ga}$ . Au final, la stabilité *in vivo* de ces chélatants semble malgré tout suffisante pour leur utilisation en imagerie.

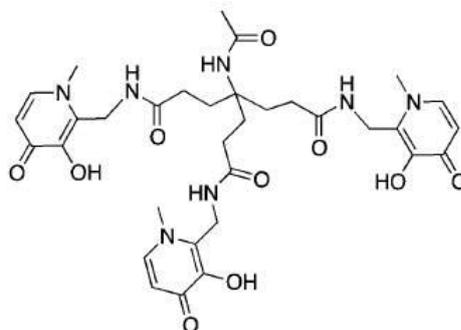
II.D.4.a L' $\text{H}_2\text{dedpa}$ 

Molécule	Fonction
$\text{H}_2\text{dedpa}$	R=H
<i>p</i> -SCN-Bn-dedpa	R= <i>p</i> -Bn-NCS

**Figure 29. Représentation schématique du dedpa et de ses dérivés**

Le  $\text{H}_2\text{dedpa}$  (acide 6,6'-(éthane-1,2-diylbis(azanediyl))bis(méthylène)dipicolinique) et son dérivé isothiocyanate ont été caractérisés avec le Ga (fig. 29). Ces chélatants hexadentés forment un octaèdre distordu avec l'ion  $\text{Ga}^{3+}$ . Ils le lient avec les atomes donneurs suivants : les deux oxygènes des « bras » carboxyliques, les azotes des pyridines et ceux des amines secondaires (252). Sa constante de stabilité est de  $\log \beta = 28,11$ . Récemment le dérivé fonctionnalisé a été conjugué avec un peptide RGD et caractérisé après radiomarquage au  $^{67/68}\text{Ga}$  *in vitro* et *in vivo* (253). Les rendements de marquages sont excellents à plus de 97% dans des conditions de radiomarquages optimales (10min d'incubation à TA). Les essais de compétitions avec l'apo-transferrine et de stabilité chez le rat sont bons. Cependant, les traceurs semblent avoir une lente clairance avec un % DI/g dans le sang élevé à 2h. Ces chélatants hydrosolubles mais ayant une charge négative augmentent la durée d'excrétion des traceurs. Cette caractéristique limite leur intérêt à l'heure actuelle.

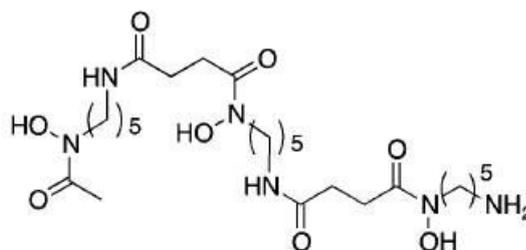
#### II.D.4.b Les HPO



**Figure 30. Représentation schématique du CP256**

Les HPO (3-hydroxy-4-pyridinone) sont des ligands du fer indiqués en clinique dans les surcharges en fer. Le dérivé CP256 est un HPO bidenté tripodal qui complexe le  $^{68}\text{Ga}$  rapidement en 5 min à TA (fig. 30). Son dérivé maléimide, le YM103, permet la conjugaison de fonction thiol des cystéines et pourrait être utilisé sur les fragments Fab' des anticorps notamment (254). Il est à noter que le pH de marquage est de 6,5 ce qui est élevé par rapport au pH optimal pour le  $^{68}\text{Ga}$  qui est de 3 - 4. Il ne sera donc pas particulièrement intéressant en considérant le comportement chimique de l'ion  $\text{Ga}^{3+}$ .

#### II.D.4.c La desferrioxamine

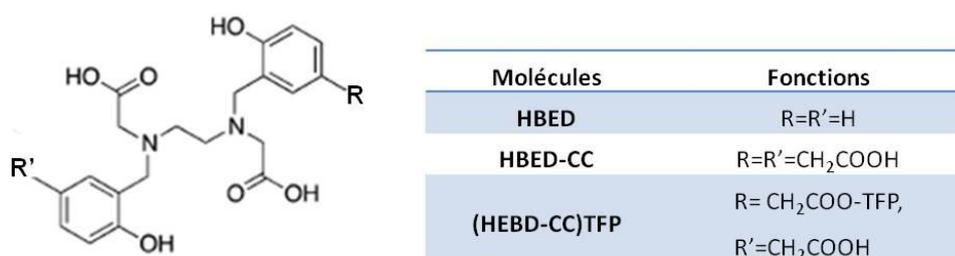


**Figure 31. Représentation schématique de la DFO**

La desferrioxamine B (DFO) est un sidérophore bactérien largement utilisé comme complexant du  $^{89}\text{Zr}$  (fig. 31). Du fait de ses caractéristiques, il a également été proposé pour la complexation du  $^{68}\text{Ga}$ . Sa constante de stabilité est de  $\log(\beta) = 28,6$  (255,256). Le dérivé isothiocyanique de la DFO a été conjugué à des vecteurs immunologiques par deux techniques différentes : en conjugaison avec une lysine ou par la réduction douce d'une fonction thiol (257). Ces deux techniques limitent la dégradation du vecteur. Cependant,

dans le cas d'une internalisation du vecteur, une décomplexation importante a été décrite (258). Celle-ci pourrait être liée à l'instabilité de la conjugaison entre le vecteur et le CBF.

#### II.D.4.d L'HBED



**Figure 32. Représentations schématiques des dérivés de l'HBED**

L'HBED (acide *N,N'*-bis[2-hydroxy-5-(carboxyéthyl)benzyl]éthylènediamine-*N,N'*-diacétique) est un dérivé voisin de l'EDTA. Il s'agit d'un chélatant acyclique décrit dans les années 60 et ayant pris un regain d'intérêt ces dernières années (259,260). L'affinité de ce ligand pour le gallium est indiquée par un  $\log(\beta)$  très élevé de 28,3 et sa constante de stabilité thermodynamique est de  $\log(\beta) = 38,5$ . Il est caractérisé par une réaction de complexation rapide avec un très bon rendement. Il a récemment été comparé au NOTA (261). Dans cette étude, le marquage du  $^{68}\text{Ga}$  a été réalisé à TA avec un pH de 4,2. L'HBED complexe le  $\text{Ga}^{3+}$  en 4 min avec un rendement de 98,7 % alors que pour le même temps, seulement 50 % de la quantité de NOTA est radiomarquée. Sa stabilité dans le sérum humain est comparable à celle du NOTA. De plus, il paraît être une alternative de choix aux chélatants macrocycliques pour le marquage de molécules thermolabiles. Depuis les années 90, son dérivé bifonctionnel HBED-CC est utilisé notamment pour le marquage d'anticorps, trop sensibles à la chaleur pour l'utilisation du DOTA (262). En 2008, une technique de conjugaison de l'HBED sur des vecteurs immunologiques a été proposée par Eder et al. (263). Un dérivé de l'HBED-CC contenant un ester tétrafluorophénol a été synthétisé à partir du complexe ferrique de l'HBED-CC, pour protéger le système de complexation de l'activation (fig.32). Dans ces conditions, un seul ester TFP est obtenu sur les deux groupes acides carboxyliques latéraux. Cependant pour être rapide et quantitative, cette technique nécessite une conjugaison à pH 9 et une décomplexation du fer. Dans cette étude, l'altération des sites de ciblage par le pH

**Les chélatants du  $^{68}\text{Ga}$  – Les chélatants bifonctionnels – Les chélatants acycliques**

très alcalin n'a pas été explorée. Enfin, il est important de noter que l'HBED-CC est le seul agent chélatant acyclique à avoir été testé avec succès en clinique (264).

Un large panel de CBF est aujourd'hui disponible pour la complexation du  $^{68}\text{Ga}$ . Bien qu'ayant une grande inertie cinétique, les macrocycles semblent moins intéressants que les chélatants acycliques qui complexent le  $\text{Ga}^{3+}$  avec une cinétique plus rapide et à TA. Mis à part l'HBED-CC, peu de ces nouveaux chélatants acycliques ont été conjugués à des vecteurs et ont été comparés entre eux. Il est aujourd'hui établi que les chélatants ont un rôle important dans le comportement *in vivo* des traceurs. Leur comportement seul doit donc continuer à être étudié afin d'adapter au mieux le chélatant à son vecteur et permettre une amélioration des propriétés cinétiques des traceurs *in vivo*.

Les études de radiochimie sur le  $^{68}\text{Ga}$  ne concernent pas uniquement l'étude des CBF. Le radiomarquage du  $^{68}\text{Ga}$  est également un domaine de recherche à l'heure actuelle. En effet, le générateur de  $^{68}\text{Ga} / ^{68}\text{Ge}$  produit un éluat dont les caractéristiques ne sont pas favorables à la réaction de complexation. La suite de ce chapitre présente la problématique de la production du  $^{68}\text{Ga}$  et les études réalisées pour son radiomarquage appliquées aux techniques de préciblage.

### III Le radiomarquage du $^{68}\text{Ga}$

La figure page suivante (fig. 33) schématise les grandes étapes de la synthèse, depuis l'éluat du générateur jusqu'au conditionnement final du produit.

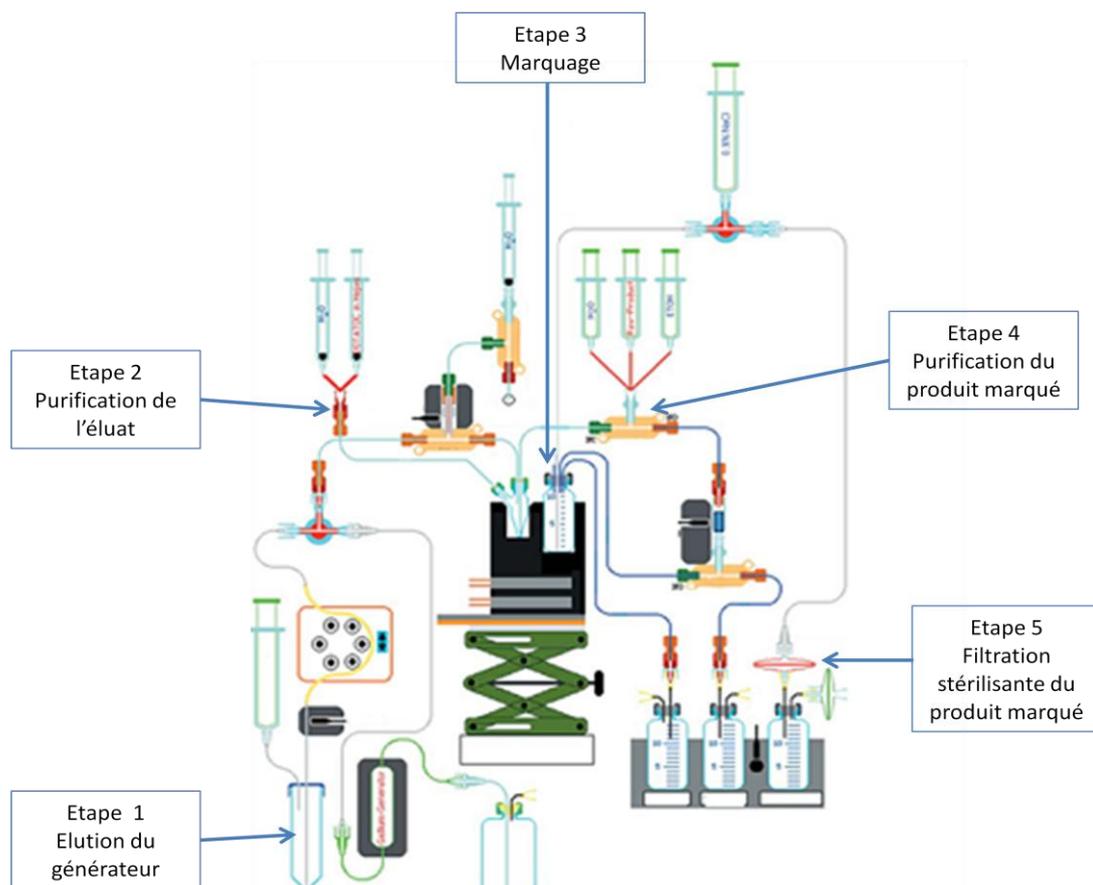


Figure 33. Schéma des grandes étapes de la synthèse du  $^{68}\text{Ga}$  DOTA-TOC (Meyer et al., 2004)

#### III.A Les contaminants de l'éluat de $^{68}\text{Ga}$

##### III.A.1 Le $^{68}\text{Ge}$

Comme nous l'avons vu précédemment, les éluations successives du générateur au cours du temps entraînent une élimination progressive du  $^{68}\text{Ge}$  et limitent la durée de vie réelle d'un générateur. Cependant, la fuite du  $^{68}\text{Ge}$  a également pour conséquence une augmentation croissante de sa présence dans l'éluat. La quantité de  $^{68}\text{Ge}$  acceptable pour la pharmacopée (PhE) est de 0,001% de l'activité totale éluee (265). Le  $^{68}\text{Ge}$  ne se comportant pas comme le  $^{68}\text{Ga}$ , cette limite a essentiellement été posée pour des raisons de dosimétrie acceptable pour le patient. La biodistribution et la dosimétrie aux différents organes du  $^{68}\text{Ge}$

**Le radiomarquage du  $^{68}\text{Ga}$  – Les contaminants de l'éluat de  $^{68}\text{Ga}$ – Le  $^{68}\text{Ge}$**

ont fait l'objet de peu d'études jusqu'à aujourd'hui. De ce fait, la question du devenir du  $^{68}\text{Ge}$  et du  $^{68}\text{Ga}$  formé *in vivo* ont été posés lors de l'écriture de la monographie de l'éluat de  $^{68}\text{Ga}$ .

Les premières études ont mesuré la dosimétrie du  $^{68}\text{Ge}$  et du  $^{68}\text{Ga}$  au niveau hépatique. Elles ont été réalisées avec du  $^{68}\text{Ge}$ -EDTA et du  $^{68}\text{Ga}$ -EDTA. La dose, lors de l'injection des complexes chez l'homme, est calculée selon les périodes des deux éléments. A activité égale, les doses prises par le foie sont environ 1000 fois plus importantes avec le  $^{68}\text{Ge}$  (266). Par la suite, une autre étude a montré la très forte augmentation de la dose avec l'augmentation modérée de contamination par le  $^{68}\text{Ge}$ . Ces premières études postulaient que le  $^{68}\text{Ge}$  était sous une forme chimique réactive permettant sa complexation au même titre que le  $^{68}\text{Ga}$ . De plus, les calculs de la dose prise par le foie étaient réalisés avec l'hypothèse que cette forme chimique était fixée définitivement sur le foie. Ces études sont aujourd'hui obsolètes puisque la forme chimique obtenues pour le  $^{68}\text{Ga}$  et le  $^{68}\text{Ge}$  sont différentes et que la fixation au foie est limitée. Les études suivantes se sont attachées à évaluer la biodistribution et la dosimétrie aux organes selon la forme chimique du Ge et selon différentes voies d'administration (267–270). Il semble que le  $^{68}\text{Ge}$  ait une cinétique variable selon sa forme chimique avec une affinité particulière pour les graisses. En 2012, Clemens Descritofoforo présente une estimation lors de l'injection de 100 MBq de  $^{68}\text{Ga}$  chez l'homme (271). Les modèles proposent une évaluation pour les reins, le foie, les poumons, la rate et la moelle osseuse quand 100 % de la dose est immédiatement fixée à l'un des différents organes. Un deuxième modèle présente les doses reçues par ces différents organes quand la dose injectée est distribuée à 20 % pour chaque organe. L'extrapolation de ces résultats donne, dans le cas d'une quantité de  $^{68}\text{Ge}$  de 0,01 % d'une dose de 100 MBq de  $^{68}\text{Ga}$  injectée, des valeurs allant de 0,65 mSv pour les reins à 6,29 mSv pour la rate avec une dose efficace de 3,23 mSv / MBq dans le cas d'une répartition de l'activité à tous les organes étudiés. Cependant l'auteur conclut sur les limites de cette étude puisque la biodistribution du  $^{68}\text{Ge}$  n'est pas réellement connue. Il justifie ainsi la limite fixée par la monographie de l'éluat de  $^{68}\text{Ga}$ .

### **III.A.2 Les contaminants métalliques**

Depuis l'utilisation en routine de générateurs de  $^{68}\text{Ge} / ^{68}\text{Ga}$ , une concertation a été lancée sur la présence de contaminants métalliques dans l'éluat de  $^{68}\text{Ga}$ . Ces contaminants sont à l'origine de la perte de rendement de marquage et de diminution de l'AS lors de la synthèse des traceurs. L'origine de ces contaminants est multiple. La première est issue de la synthèse du  $^{68}\text{Ge}$ .

#### **III.A.2.a Les contaminants métalliques issus de la production du $^{68}\text{Ge}$**

Le  $^{68}\text{Ge}$  est produit par cyclotron pour la fabrication du générateur. Depuis 2001, le protocole  $\text{Ga}(p,xn)^{68}\text{Ge}$  pour la production de générateur à visée médicale a été validé par l'Agence Internationale à l'Energie Atomique (AIEA) (272). Les cibles sont fabriquées à partir de différentes formes chimiques du Ga notamment en trioxyde de di-gallium ( $\text{Ga}_2\text{O}_3$ ) ou en Ga métal. Dans ce cas, le Ga sera encapsulé dans le niobium (Nb) ou l'aluminium (Al) ou sera mélangé sous la forme d'un alliage (GaNi ou GaAg). L'encapsulation est indispensable pour éviter l'évaporation du Ga métal provoquée par la chaleur lors de l'irradiation. Dans le cas de l'oxyde de Ga, elle l'empêche de corroder les parties métalliques et d'induire des contaminants. Récemment, de nouvelles cibles en suboxyde de gallium  $\text{Ga}_2\text{O}$  ont été proposées, mélange de  $\text{Ga}_2\text{O}_3$  et de Ga métal (209,273). Elles ont l'avantage d'être inertes face aux métaux et de supporter des très fortes températures.

Le point critique pour la production de  $^{68}\text{Ge}$  de haute pureté est la séparation du radionucléide des autres métaux présents dans les cibles lors de sa production. Les différents protocoles de traitement ont été décrits par Mirzadeh et al en 1996 (274). La méthode principale d'extraction est un traitement en acide concentré pour dissoudre la cible, suivi d'extractions liquide - liquide successives en  $\text{CCl}_4$  en présence de peroxyde d'hydrogène ou d'HCl. Le Ge est extrait sous la forme  $\text{GeCl}_4$ . Puis un passage en milieu aqueux faiblement acide permet son conditionnement sous sa forme d'intérêt. Au laboratoire de Brookhaven, le  $^{68}\text{Ge}$  est extrait par une chélation avec le DTPA. Sous cette forme, il ne permet pas la production de générateur et devra subir un traitement supplémentaire pour être décomplexé.

### **Le radiomarquage du $^{68}\text{Ga}$ – Les contaminants de l'éluat de $^{68}\text{Ga}$ – Les contaminants métalliques**

Historiquement, les centres de recherche produisaient de faibles quantités de  $^{68}\text{Ge}$  à partir de cyclotron *in situ*. Ainsi en 1981, Schuhmacher et al créaient une faible quantité de  $^{68}\text{Ge}$  (3,7 kBq) à partir d'une cible de  $^{69}\text{Ga}_2(\text{SO}_4)_3$  par bombardement de flux protonique de 20 MeV (202). Durant cette expérience, ils produisaient également du  $^{54}\text{Mn}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{65}\text{Zn}$ .

Ces impuretés, issues de réactions parasites, sont nombreuses et dépendantes de la technique de production et du type de cible. Le Nb ou l'Al d'encapsulation produisent des contaminants radionucléidiques à périodes longues, l' $^{88}\text{Y}$  et le  $^{88}\text{Zr}$ . Lors d'une irradiation à forte énergie, du  $^{65}\text{Zn}$ ,  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{58}\text{Co}$  à période longue ainsi que du  $^{69}\text{Ge}$  et du  $^{67}\text{Ga}$  de périodes courtes sont créés. Pour éliminer les éléments de périodes courtes, les cibles sont laissées en décroissance durant 2 semaines avant leur traitement. Les extractions successives permettent ensuite de purifier le  $^{68}\text{Ge}$ .

Cependant, la pureté du  $^{68}\text{Ge}$  ne tient pas compte de la présence de  $^{71}\text{Ge}$  qui est produit par la réaction  $^{71}\text{Ga} (p,xn) ^{71}\text{Ge}$ . Le  $^{71}\text{Ga}$  est l'un des isotopes du Ga retrouvé à plus de 30% naturellement dans le Ga métal utilisé pour la fabrication des cibles.

La séparation sans entraîneur ne permet pas d'isoler complètement le  $^{68}\text{Ge}$ . L'entraîneur est une substance dont les propriétés sont similaires voire identiques à celles de l'élément qui est à l'état de trace (ex : l'entraîneur  $\text{F}_2$  pour extraire le  $^{18}\text{F}$ ). Lors du marquage, l'entraîneur entre en compétition avec le radionucléide pour la fixation sur la molécule. Il diminue donc l'AS du produit radiomarqué.

Au final lors de la purification, du Ga naturel ainsi que d'autres contaminants chimiques sont entraînés. Le principal élément est le Fe mais des traces de Nb, Cu, Pb, Co, Cr, Cd, Ni, Mn et Al ont pu être dosées par des méthodes sophistiquées de détection (202,209,273). Ces contaminants sont issus des matériaux utilisés. Ils devront être éliminés directement lors de l'éluat du générateur pour empêcher toute compétition lors du radiomarquage d'un vecteur par le  $^{68}\text{Ga}$ .

#### **III.A.2.b Les autres sources de contaminations**

La décroissance du  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  en  $^{68}\text{Zn}^{2+}$  est également une source de contamination. En effet, la période du  $^{68}\text{Ga}$  étant courte, une accumulation du  $^{68}\text{Zn}^{2+}$  est à prévoir dans le générateur

### **Le radiomarquage du $^{68}\text{Ga}$ – Les contaminants de l'éluat de $^{68}\text{Ga}$ – Les contaminants métalliques**

si les intervalles d'éluion sont supérieurs à 10 périodes. Lors du radiomarquage, le  $^{68}\text{Zn}^{2+}$ , considéré comme un contaminant chimique, pourra perturber les réactions de complexation. Dans le cas d'une utilisation ponctuelle du générateur, une élimination préalable du  $^{68}\text{Zn}$  peut être nécessaire. Elle est réalisée par une première éluion de purification du générateur appelée pré-éluion qui sera éliminée. Cette pré-éluion aura un impact sur le temps de production du traceur puisqu'un délai sera nécessaire avant la réalisation de la seconde éluion. Ce délai s'accompagnera d'une diminution du rendement d'éluion qui ne sera pas optimal dans ce cas. L'impact sera surtout important pour un générateur en fin de vie où l'activité éluee est plus faible.

D'autres contaminants issus de la colonne comme le Ti ou le Sn peuvent également être détectés. Enfin, la présence de contaminants dans le matériel lors du radiomarquage a également été mise en cause, surtout pour les flacons en verre non traités et certains plastiques (193).

### **III.B Les techniques de purification de l'éluat**

Pour réduire les quantités en contaminants et ainsi maintenir une AS suffisante, une purification de l'éluat (appelée pré-purification de l'éluat) est donc nécessaire après chaque éluion. Elle garantit la pureté radiochimique de l'éluat (la forme chimique du radionucléide d'intérêt) et sa pureté radionucléidique (le radionucléide d'intérêt). Elle permettra également de changer le solvant d'éluion (HCl) en un tampon qui maintiendra le pH réactionnel dans l'intervalle souhaité.

Plusieurs techniques de pré-purification ont été mises au point. Les caractéristiques de chacune d'elles sont résumées dans le tableau 8.

Méthodes de pré-purification	Solvant final avant marquage	Compatibilité	Inconvénients	Références
Fractionnement	Solvant d'éluat	[HCl] < 1 M	Contaminants métalliques et $^{68}\text{Ge}$	(189,206,208)
Échange anionique	Eau pure	Tous types	Étape supplémentaire d'acidification	(188,202,206,221,275)
Échange cationique	Acétone / HCl	[HCl] < 1 M	Traces d'acétone	(195,205,206,276,277)
	NaCl 5 M/ HCl		hypertonie de la solution	(278)

**Tableau 8. Caractéristiques des différentes méthodes de pré-purification**

### III.B.1 Le fractionnement

La technique par fractionnement est mécanique. Le générateur est élué mL par mL par le solvant d'éluat. Ce principe repose sur la distribution gaussienne de la radioactivité dans le volume total d'éluat. En pratique, seules les fractions centrales sont conservées, les autres sont éliminées. L'activité volumique est de ce fait très élevée avec un rendement d'éluat satisfaisant.

La première description de cette méthode avec le générateur d'Obninsk a été réalisée par Breeman et al (208). L'éluat est réalisé en 24 fractions de 0,25 ml chacune. Tous les résultats de dosage des métaux sont présentés dans le tableau 9. Ils montrent que l'utilisation des fractions centrales 6 à 9 permet de conserver 80 % du rendement d'éluat totale dans un volume de 1 mL. D'après les résultats de dosage, l'éluat est conforme à la monographie.

L'équipe de De Blois utilise l'éluat fractionné pour caractériser le générateur IThemba (206). Douze fractions de 0,5 mL sont réalisées. Les fractions 5 à 7 correspondent à 75 % du rendement total d'éluat. Comme précédemment, le pourcentage de  $^{68}\text{Ge}$  est évalué au moins 24 h après éluat. Il reste cependant supérieur à la monographie et invalide cette technique pour le générateur IThemba.

**Le radiomarquage du  $^{68}\text{Ga}$  – Les techniques de purification de l'éluat- Le fractionnement**

Le générateur en nanoparticules de Zr présenté par Chakravarty et al a également été testé en élution fractionnée. Sur 4 mL élués, le profil d'élution montre que 90 % de l'activité est retrouvée dans les fractions 3 et 4 de 0,5 mL chacune. Le pourcentage de  $^{68}\text{Ge}$  est évalué sur 24 h et paraît conforme à la PhE (cf. tab. 9). Cependant, ni le Zn, ni le Fe ne sont dosés par les auteurs. D'autres essais devront donc être réalisés pour valider cette purification pour ce générateur.

Référence	% $^{68}\text{Ge}$	Zn résultats	Fe résultat	Activité éluee (MBq)	Zn <sup>2+</sup> µg / GBq	Fe <sup>3+</sup> µg / GBq	Conformité PhE
Breeman (208) Générateur Obninsk	0,00056 (a)	< 50 nM	< 50 nM	286	0,0013	0,0009	Conforme
De Blois (206) Générateur IThemba	0,01 (a)	< 10 ppm (b)	< 10 ppm (b)	-	-	-	Non conforme
Chakravarty (189) Générateur ITG	1.10 <sup>-5</sup>	-	-	666	-	-	-

**Tableau 9. Résultats des dosages de métaux et du  $^{68}\text{Ge}$  pour le fractionnement**

(a) Le %  $^{68}\text{Ge}$  dans l'éluat est mesuré plus de 24h après l'élution.

(b) Dosages réalisés sur la totalité du volume élué.

Il est à noter que l'équipe de Schoffelen propose également la technique de fractionnement pour le marquage de l'haptène divalent IMP-288 (voir chapitre 1) (169). Depuis, l'équipe a réalisé une autre étude utilisant leur haptène conjugué avec un DOTA et radiomarqué au  $^{68}\text{Ga}$  mais la technique par fractionnement reste celle qu'ils utilisent (279).

### **III.B.2 La chromatographie par échanges d'anions**

En solution d'HCl concentré à minimum 3 M, l'ion  $\text{Ga}^{3+}$  forme des complexes anioniques  $[\text{GaCl}_6]^{3-}$  et  $[\text{GaCl}_4]^-$  qui sont retenus par une colonne échangeuse d'anions alors que le Ge et une partie des impuretés métalliques sont directement élués. Au départ, cette technique avait été mise au point pour décomplexer le  $^{68}\text{Ga}$  de son solvant d'éluion (193,280,281).

Succinctement, l'éluat est acidifié pour obtenir une concentration en HCl de 4 à 5 M. Puis la solution est injectée sur la colonne qui a été préalablement conditionnée. Après différents rinçages de la colonne, le  $^{68}\text{Ga}$  est élué. Les différentes techniques de conditionnement et les solvants sont présentés dans le tableau 10.

Les premiers essais de pré-purification sont réalisés par Neirinckx et al (275). Bien qu'ils confirment l'intérêt de ce type de colonne pour éliminer le  $^{68}\text{Ge}$ , l'utilisation d'acide fluorhydrique très toxique comme solvant d'éluion limite sérieusement l'intérêt de leurs travaux.

Schuhmacher et al proposent une technique de montage en série de la colonne du générateur maison élué en 10 ml d'HCl 4,5M avec une colonne échangeuse d'anions (202). Elle leur permet de réduire le volume réactionnel et changer de solvant. Pour les auteurs, l'intérêt réside dans le fait que l'éluat est déjà à une concentration d'HCl de 4,5 M et n'a pas besoin de subir l'étape d'acidification. Le rendement est de 78 % avec une contamination de  $^{68}\text{Ge}$  inférieure à 0,0005 %. Aucun essai de dosage des métaux n'est réalisé par les auteurs. Meyer et al. reprennent le protocole de Schuhmacher et al, en ajoutant une étape d'acidification de l'éluat du générateur russe d'Obninsk (188). L'éluion est réalisée en eau pure avec un volume de 80  $\mu\text{L}$ . Ils obtiennent ainsi plus de 90 % de rendement. Il est intéressant de remarquer que le temps complet de marquage est identique pour les deux protocoles. L'activité volumique de cette technique est très élevée avec 10 GBq / mL et présage d'un bon rendement de marquage.

Velikyan et al. automatisent la technique et testent plusieurs colonnes (221). Les meilleurs rendements sont obtenus avec l'AG-1 X8 et la colonne commerciale Chromafix SAX SPEC (45mg). L'éluion réalisée avec 200  $\mu\text{L}$  d'eau déionisée permet de récupérer 90 % du  $^{68}\text{Ga}$  fixé sur ces colonnes. Le pourcentage de  $^{68}\text{Ge}$  et les contaminants métalliques sont dosés directement sur l'éluat avant purification. Pour De Blois et al., l'AG-1 X8 ne permet pas

**Le radiomarquage du  $^{68}\text{Ga}$  – Les techniques de purification de l'éluat- La chromatographie par échanges d'anions**

d'obtenir de bons rendements. Elle n'entraîne qu'un recouvrement de 55 % de l'activité de  $^{68}\text{Ga}$  fixé. Cependant, le protocole précédent n'est pas totalement respecté notamment pour le conditionnement de la résine (tab. 10). Comme précédemment, les auteurs comparent ces colonnes « fait-maison » avec plusieurs colonnes commerciales dont un équivalent de la chromafix. Contrairement à Velikyan et al., ils obtiennent de meilleurs résultats avec un volume en eau supérieur à 400  $\mu\text{L}$  en utilisant la colonne Oasis WAX (30 mg). De façon intéressante, lors de l'étape de lavage préalable à l'élution de la colonne, ils remplacent la solution d'HCl 5 M par une solution de NaCl 5 M. Malgré une augmentation du pH importante défavorable au marquage, les rendements d'élution sont identiques dans les deux conditions.

	<b>Schumacher (202)</b>	<b>Meyer (188)</b>	<b>Velikyan (221)</b>	<b>De Blois (206)</b>
<b>Eluat avant pré-purification</b>	10 mL à 4,5 M d'HCl	25 – 30 mL à 5,5 M d'HCl ou 23 mL à 5,5 M d'HCl	11 mL à 4 M d'HCl	6 mL à 5 M d'HCl
<b>Types de colonne <sup>(a)</sup></b>	AG-1 X8 (3 * 0,6 cm, 100 – 200 mesh)	AG-1 X8 (3 * 0,18 cm, 100 – 200 mesh)	AG-1 X8 (dia. 0,4 cm, 200 – 400 mesh) Chromafix SAX (45 mg)	Oasis WAX (30 mg)
<b>Conditionnement de la colonne</b>	-	-	HCl 5M puis HCl 1 M puis eau puis HCl 5 M	2 mL d'EtOH puis 2mL d'HCl 5 M
<b>Solution de rinçage</b>	Pas de rinçage car montage en série	1 mL d'HCl 5,5 M puis séchage	2 mL d'HCl 4 M puis séchage	2 mL d'HCl 5 M ou de NaCl 5 M
<b>Solvant d'élution</b>	4 ml d'eau ultra-pure ou d'HCl 0,5 M	80 $\mu\text{L}$ d'eau d'eau pure	200 $\mu\text{L}$ d'eau déionisée	> 400 $\mu\text{L}$ d'eau ultra-pure

**Tableau 10. Présentation des différents protocoles de pré-purification anionique**

(a) ne sont présentées que les colonnes retenues par les auteurs

### **III.B.3 La chromatographie par échange de cations**

Les ions  $\text{Ga}^{3+}$  sont directement échangeables sur une colonne échangeuse de cations. Cette propriété a donc été étudiée pour la pré-purification de l'éluat. Cependant, ce type de colonne retient également la plupart des contaminants métalliques qui sont sous forme cationique en solution aqueuse. La méthode de chromatographie sur colonne échangeuse d'ions est identique quelle que soit la colonne. Les étapes sont donc les mêmes que pour la chromatographie échangeuse d'anions hormis pour l'étape d'acidification de l'éluat.

Strelow et al. sont les premiers à tester différents protocoles pour la séparation du  $^{68}\text{Ga}$  et de contaminants métalliques (276). Ils observent que la diminution du pH et l'augmentation de la proportion d'acétone dans le solvant améliorent l'élution du Ga. Cependant, l'évaporation de l'acétone entraîne le Ga et diminue l'activité de l'éluat. Pour compléter les données sur la séparation avec d'autres métaux, Zhernosekov et al. adaptent le protocole d'élution de Strelow et al. (tab. 11) en testant séparément la rétention du  $\text{Fe}^{3+}$ , du  $\text{Ge}^{4+}$ , du  $\text{Zn}^{2+}$  et du  $\text{Ti}^{4+}$  avec la même colonne (277). Ils montrent que les contaminants métalliques sont bien retenus, excepté le  $\text{Fe}^{3+}$  pour lequel environ 50 % de la quantité fixée est éluée. Ils déterminent la quantité d'acétone résiduelle produite aux différentes étapes de la synthèse. Dans le produit fini, le taux est inférieur à 0,5  $\mu\text{g}$ .

Asti et al. évaluent la quantité de très nombreux contaminants métalliques dont le  $\text{Fe}^{3+}$ , le  $\text{Zn}^{2+}$  et le  $\text{Ti}^{4+}$  qu'ils dosent, avant purification d'une part et dans le produit fini d'autre part. Dans l'éluat, ces métaux sont en concentration très supérieure aux normes de la PhE. *A contrario* dans le produit fini, les résultats sont satisfaisants. Cependant, les auteurs ne caractérisent pas l'éluat. Ocak et al. sont les premiers à réellement doser les métaux après la pré-purification. Ils automatisent la méthode de Zhernosekov et al. Pour cela, ils utilisent la colonne Strata-X-C et modifient le protocole d'élution dont l'étape de rinçage fait chuter le rendement (tab. 11). Les résultats obtenus pour le Zn et le Fe sont conformes à la PhE. Le pourcentage de  $^{68}\text{Ge}$  n'est évalué qu'à la mise en place du générateur. Aucune investigation n'est réalisée après plusieurs mois d'utilisation. Les auteurs rapportent simplement que 90 % du  $^{68}\text{Ge}$  présent dans l'éluat est purifié par cette technique.

**Le radiomarquage du  $^{68}\text{Ga}$  – Les techniques de purification de l'éluat- La chromatographie par échanges de cations**

De Blois et al. évaluent également le générateur  $\text{SnO}_2$  avec une pré-purification cationique. Cependant, malgré une tentative d'optimisation des techniques décrites préalablement, le rendement d'élution reste faible par rapport aux autres études.

Mueller et al ont proposé récemment une nouvelle technique de purification sans l'utilisation de l'acétone (278,282). En effet, bien que la présence d'acétone soit tolérée par la monographie de l'éluat de  $^{68}\text{Ga}$ , elle est considérée par *l'International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use* (ICH) comme un solvant avec un faible potentiel de toxicité (de niveau 3). De ce fait, la quantité d'acétone autorisée est de 5000 ppm. Les différentes études ont montré que cette limite est bien supérieure au taux résiduel d'acétone retrouvé dans l'éluat ou le produit fini (283). Cependant en clinique, la substitution de l'acétone par un solvant non toxique doit être préférée. La solution proposée par l'équipe de Mueller est l'utilisation de NaCl concentré à 5M et acidifié par une petite quantité d'HCl 5,5M. Le rendement d'élution est très élevé à plus de 95%. L'automatisation simple de la technique rend aujourd'hui la purification de l'éluat par chromatographie cationique la méthode la plus utilisée en clinique.

**Le radiomarquage du  $^{68}\text{Ga}$  – Les techniques de purification de l'éluat- La chromatographie par échanges de cations**

	<b>Zhernosekov (277)</b>	<b>Asti (195)</b>	<b>Ocak (205)</b>	<b>Mueller (278)</b>
<b>Eluat avant pré-purification</b>	7 mL à 0,1 M d'HCl	7,5 mL à 0,1 M d'HCl	6 mL à 0,1 M d'HCl	10mL de 0.1M HCl
<b>Types de colonne <sup>(a)</sup></b>	AG 50W X8 (200 – 400 mesh, 50 mg , 5 * 2 mm)	AG 50W X8 (200 – 400 mesh)	Strata-X-C (30 mg)	Bond Elut-SCX (100mg, 1mL)
<b>Conditionnement de la colonne</b>	1 mL d'HCl 4 M puis 1 mL d'eau	-	-	1 mL de HCl 5.5M et 10mL d'eau
<b>Solution de rinçage</b>	0,6 mL d'acétone / 0,15 M HCl (80 / 20)	1 mL d'acétone / 0,15 M HCl (80 : 20)	-	
<b>Solvant d'élué</b>	0,4 mL d'acétone / 0,05 M HCl (97,6 : 2,4)	0,4 mL d'acétone / 0,05 M HCl (98 :2) en 2 étapes d'abord 150 $\mu\text{L}$ puis 2 min après 250 $\mu\text{L}$	0,8 mL acétone / HCl 0,002 M (98 :2) puis 3 mL d'eau ultra-pure	500 $\mu\text{L}$ NaCl 5M / 12.5 $\mu\text{L}$ HCl 5.5M
<b>Concentration en acétone dans le produit fini</b>	< 0,5 $\mu\text{g}$	< 0,1 mg / L	-	-

**Tableau 11. Présentation des protocoles de pré-purification cationique****III.C Les conditions de radiomarquage**

Les conditions de radiomarquages présentées ici sont celles utilisées pour les vecteurs peptidiques de type haptène. Comme le présente le chapitre 1, les techniques de préciblage utilisent de petites molécules souvent peptidiques et de structure simple (en opposition aux structures des Ac). Elles sont stables dans une large zone de pH et à des températures élevées. De ce fait, elles acceptent des conditions stringentes de radiomarquage notamment en terme de température de chauffage et de pH, proches de celles utilisées pour les peptides.

Il a été établi que le coefficient d'affinité des CBF est élevé pour le  $^{68}\text{Ga}$  à un pH compris entre 3 et 5 (237). Pour des pH supérieurs à 5, des colloïdes oxo- et hydroxo-gallium se

**Le radiomarquage du  $^{68}\text{Ga}$  – Les conditions de radiomarquage**

forment empêchant la réaction de marquage (188). Un autre facteur limitant est le chauffage, indispensable pour autoriser la réaction avec un bon rendement. Pour un peptide, celle-ci devra être inférieure à  $100^\circ\text{C}$ . Au-delà, le produit pourra être oxydé ou dégradé. Lors de l'étape de purification, il ne s'adsorbera pas correctement sur la colonne de purification et une perte sera observée (205). Un essai de chauffage par des micro-ondes sur des peptides a montré une diminution du temps de marquage d'un facteur 5 à 10 selon le solvant (221). Les volumes utilisés sont très variable d'un auteur à l'autre. Néanmoins, dans le cadre d'une utilisation en clinique, ils seront dépendants de la concentration finale en vecteur.

Le  $^{68}\text{Ga}$  possède une chimie contraignante. De ce fait, les conditions de radiomarquage des vecteurs sont très restrictives. Historiquement, la commercialisation des générateurs a donné lieu à de nombreuses études de complexation du DOTA conjugué aux dérivés de la somatostatine. A l'heure actuelle, ces traceurs sont les plus étudiés en clinique. Le DOTA sert donc aujourd'hui de chélatant référent. D'autres chélatants ont fait récemment leur apparition comme le NOTA ou l'HBED. Du fait des nombreuses données cliniques existantes sur le DOTA, les conditions de complexation restent toujours similaires pour l'utilisation clinique de nouveaux vecteurs conjugués avec ces chélatants. Elles sont résumées dans le tableau 12 selon le solvant de réaction utilisé.

	<b>Acétate de sodium</b>	<b>HEPES</b>
<b>Eluat</b>	0,1 et 0,6 M HCl ou eau	0,1 et 0,6 M HCl, eau ou acétone / HCl
<b>Concentration en peptide</b>	$10^{-3}$ M	$10^{-3}$ M
<b>Quantité de peptides</b>	10 à 40 nmol	2 à 20 nmol
<b>pH</b>	3 - 5	3 - 5
<b>volume</b>	200 $\mu\text{L}$ à 5 mL	200 $\mu\text{L}$ à 2 mL
<b>température</b>	80 – 100 $^\circ\text{C}$	80 – 100 $^\circ\text{C}$
<b>temps</b>	5 - 20 min	4 – 10 min

**Tableau 12. Conditions générales de synthèse selon le tampon de la réaction**

### **III.C.1 Les tampons réactionnels**

Le tampon de réaction est un facteur important dans le rendement de marquage et l'AS du produit. Son rôle est de fixer le pH lors de la réaction. Pour cela, les auteurs utilisent des tampons dont la propriété principale est de conserver un pH constant lors d'un apport faible d'acide ou de base. Leur concentration dépendra du pH de l'éluat et donc du type de pré-purification que l'éluat aura préalablement subi.

L'acétate de sodium a été proposé pour sa parfaite innocuité chez l'homme, pour son utilisation fréquente dans la synthèse de médicaments et pour son pKa à 4,7 évitant la formation des hydroxo-complexes (284). Griffith et al. proposent un conditionnement du vecteur par l'acétate d'ammonium à pH 5,5 pour le radiomarquage d'un haptène conjugué au DOTA, l'IMP 241. Le pH de la réaction est fixé à 4 après ajout de l'éluat ce qui est favorable pour le radiomarquage. Le mélange est chauffé à 95°C durant 15 min. L'étude ne mentionne pas le rendement de ce radiomarquage. Un autre essai avec de l'acétate d'ammonium a été publié par Chakravarty et al (189). Malgré une très grande pureté du produit, l'AS est faible à 21 MBq/ nmol. La faible concentration de la solution en peptide peut expliquer ce résultat décevant. D'autres études devront donc être réalisées.

Dans le cas d'un éluat en acétone / HCl, l'eau sera préférée au tampon acétate car le pH de la solution est déjà à 3,5.

Une compétition entre le sodium provenant de l'acétate et le Ga a été décrite (188). Cette hypothèse est peu probable et une complexation relative des acétates avec l'ion  $\text{Ga}^{3+}$  semble plus réaliste. Mais de ce fait, un tampon non ionique et non complexant, l'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) a été proposé. Ce tampon a montré une action favorable autant sur le rendement de marquage que sur l'AS du produit (221,277). Grâce à ce tampon, les temps de réaction, la quantité de peptides ont été fortement diminués (169,206,221,279). Cependant, sa toxicité n'a jamais été clairement évaluée. Il est non classé par les ICH et doit être employé avec précaution chez l'homme. La PhE a donc fixée arbitrairement une quantité d'HEPES inférieure à 200  $\mu\text{g}$  dans le produit fini (271). Cette limite correspond à la limite de détection du produit par CCM.

### **Le radiomarquage du $^{68}\text{Ga}$ – Les conditions de radiomarquage – Les tampons réactionnels**

De Blois et al. bloquent la réaction par l'ajout d'éthanol dans la solution en fin de synthèse (206). Ils ajoutent également de l'acide ascorbique (anti oxydant qui empêche la radiolyse) et de la méthionine (protecteur).

Schoffelen et al. proposent de bloquer la réaction de radiomarquage par l'ajout d'un excès d'EDTA comme pour les émetteurs  $\beta^-$  ( $^{177}\text{Lu}$  ou  $^{90}\text{Y}$ ) (169). L'intérêt d'un tel blocage est limité car l'irradiation entraînée par le  $^{68}\text{Ga}$  est de courte durée et n'a pas le même impact que pour des émetteurs de radiothérapie interne.

L'AS du produit fini est relativement identique pour tous les auteurs à 50 MBq / nmol donc bien inférieure à l'AS théorique (277). Breeman et al. obtiennent une AS de 1 GBq / nmol (208). Cependant, cette valeur calculée par des tests *in vitro* avec du  $^{67}\text{Ga}$  ne reflète pas les conditions de réaction avec un éluat de  $^{68}\text{Ga}$  dans lequel résident des contaminants métalliques.

### **III.C.2 Les vecteurs**

Le  $\text{Ga}^{3+}$  et le CBF se fixant dans un rapport 1 pour 1, la quantité de vecteur utilisée et sa concentration dans la solution réactionnelle vont donc naturellement influencer le rendement de marquage. La plupart des auteurs s'accordent sur une concentration de  $10^{-3}$  M finale dans la solution. Ceci conditionne le volume de réaction qui pourra varier entre 0,7 mL et 5 mL selon la masse de produit présent dans le conditionnement commercial (285). Une quantité minimum de 14 nmol de peptides a été proposée. Dans ce cas, les rendements de marquages sont de 75-95 %. En dessous de cette quantité, le phénomène d'adsorption des molécules sur le verre est pour eux trop important (195,277). Actuellement, l'optimisation des systèmes automatisés au niveau des réacteurs limite l'adsorption des vecteurs à leur surface. Les quantités de peptide peuvent être plus faibles ce qui augmente l'AS.

L'équipe de Schoffelen propose un radiomarquage de 3,4 nmol d'IMP-288. Cependant, le rendement de radiomarquage avant purification du produit fini n'est pas précisé.

Velikyan et al. obtiennent des rendement de marquage de plus de 98 % grâce à leur système de micro-onde avec des quantités de peptides de l'ordre de la nanomole.

**Le radiomarquage du  $^{68}\text{Ga}$  – Les conditions de radiomarquage – Les vecteurs**

De façon consensuelle, les auteurs s'accordent sur une quantité de vecteur à marquer de 20 à 40 nmol soit par exemple pour le DOTA-NOC (traceur en essai clinique dérivé de l'octréotide et indiqué dans les tumeurs neuro-endocrines) une masse de 30 à 60  $\mu\text{g}$ . Selon l'EANM, une injection de 100 à 300 MBq de traceur est préconisée (286). Dans ce cas, pour une AS de 50 MBq / nmol, la quantité de peptide sera au maximum de 6 nmol soit 9  $\mu\text{g}$  pour le DOTA-NOC. La monographie donne une quantité de peptide maximale par dose injectée de 50  $\mu\text{g}$ . Cette valeur permet donc de valider une synthèse même si une forte diminution de l'AS est observée notamment avec le vieillissement du générateur (188).

Le cas de l'imagerie par AES est plus critique. En effet, la quantité d'haptène à injecter est dépendante de la quantité d'AcBs préalablement injecté. De ce fait, une AS minimale est indispensable pour que les proportions entre les deux molécules soient préservées. Comme le montre l'étude de Schoffelen, une augmentation importante de la quantité de TF2 sature les sites antigéniques (169). L'injection de doses croissantes de TF2 entraîne une réduction de l'activité dans la tumeur pour une dose fixe d'IMP-288 radiomarqué. Le facteur limitant est donc l'activité injectable d'haptène minimale qui dépendra de sa quantité radiomarquée et donc de l'AS de la réaction de complexation.

# **PARTIE EXPÉRIMENTALE**

---

# OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE

---

L'imagerie TEP est aujourd'hui devenue incontournable pour le diagnostic de nombreuses pathologies notamment en oncologie et en neurologie. Elle repose sur le principe de l'imagerie fonctionnelle d'une cible possédant une activité biologique directement liée à la pathologie ou surexprimée lors du développement de celle-ci. Depuis le début des années 90, le  $^{68}\text{Ga}$  est à nouveau réévalué pour l'imagerie TEP. Son regain d'intérêt est dû à sa technique de production utilisant un générateur isotopique. Il serait, pour de nombreux cliniciens, le pendant TEP du  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , émetteur  $\gamma$  le plus utilisé en Médecine Nucléaire. De plus, la radiochimie du  $^{68}\text{Ga}$  est proche de celles d'émetteurs  $\beta^-$  comme le  $^{177}\text{Lu}$  ou  $^{90}\text{Y}$  utilisés en radiothérapie interne vectorisée (RIV). Plusieurs techniques sont étudiées en RIV dont la technique de préciblage par AES (*Affinity Enhancement System*) qui fait l'objet de plusieurs essais cliniques. L'un des enjeux majeurs de l'AES est d'améliorer les résultats obtenus dans le traitement des tumeurs solides qui restent à l'heure actuelle moins performantes que ceux obtenus dans le lymphome. Afin de personnaliser le traitement et réduire la dosimétrie pour le patient, l'un des objectifs de recherche est l'emploi de traceurs théranostiques où le médicament peut être radiomarqué par un émetteur  $\gamma$  ou  $\beta^+$  pour réaliser une imagerie prédictive puis sans modification du vecteur, être radiomarqué par un émetteur  $\beta^-$  ou  $\alpha$  pour traiter le patient de façon individuelle. Le  $^{68}\text{Ga}$  paraît donc aujourd'hui être un radionucléide intéressant dans les applications théranostiques utilisant la technique AES.

Ce travail de thèse rentre dans le cadre de ce projet. Il est proposé par l'équipe 13 de l'unité INSERM U892 qui est spécialisée dans les techniques de préciblage par la méthode AES en partenariat avec l'équipe INSERM U1039 qui possède une expertise en imagerie préclinique du petit animal.

**Le premier objectif a été de synthétiser par voie chimique l'anticorps bispécifique (AcBs).** L'AcBs devait posséder un premier versant reconnaissant l'ACE, antigène commun à de nombreuses tumeurs solides. Pour cela, l'anticorps monoclonal murin F6, déjà étudié par l'équipe, a été proposé. Le deuxième versant de ce vecteur devait reconnaître un haptène divalent synthétisé et breveté par l'équipe 13 INSERM U892, l'haptène di-HSGL (histidine-serine-glycine-lysine) (287). Pour ce versant, l'anticorps monoclonal murin 679, reconnaissant la séquence HSG (histidine-serine-glycine) de l'haptène IMP, a été utilisé.

## **Partie expérimentale – Objectifs du travail de thèse**

L'affinité de l'AcBs F6 X 679 devait ensuite être évaluée avec le nouvel haptène di-HSGL. Un objectif secondaire évaluait la possibilité d'utiliser des anticorps humanisés ou humains pour la synthèse par voie chimique afin de réduire considérablement l'immunogénicité du vecteur pour le patient.

**Le deuxième objectif était d'étudier différents chélatants du  $^{68}\text{Ga}$  dans le but de fonctionnaliser l'haptène et de valider son radiomarquage.** Pour réaliser ces études radiochimiques, deux chélatants ont donc été proposés : le DOTA et l'HBED. Les études avaient pour but de faire un choix entre les deux chélatants et d'optimiser les conditions de radiomarquage avec le  $^{68}\text{Ga}$ .

**Enfin le troisième objectif était d'effectuer la validation de ce nouveau système par des études d'imagerie *in vivo* chez la souris xénogreffée avec une lignée cellulaire d'adénocarcinome colique d'origine humaine exprimant la cible d'intérêt, la lignée LS174T.**

# CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE DES ANTICORPS BISPÉCIFIQUES

---

## I Matériels et méthodes

### I.A Matières premières

L'ensemble des réactifs est commercialisé par la société Sigma-Aldrich (USA). Les solutions tampons sont réalisées par le mélange des acides et des bases conjuguées en proportions variables dans de l'eau UP (eau ultra-pure, résistivité de 18,2 MΩ.cm). Les solutions commerciales sont toutes de qualité analytique pour limiter la contamination par des métaux.

Les anticorps, qui ont été choisis comme matières premières pour la réalisation des AcBs, sont de différentes origines. Ils ont déjà fait l'objet de nombreuses études dans la littérature et leur production est validée. De ce fait, un simple contrôle d'intégrité par électrophorèse sur gel de polyacrylamide a été réalisé préalablement à leur utilisation.

L'Acm hLL2 est un anticorps monoclonal humanisé anti CD-22 (Immunomedics, USA) fourni par le CHU de Nantes dans le cadre d'un accord de transfert avec l'industriel. Cet anticorps est en solution à la concentration de 10mg/mL en tampon phosphate à pH 7.

L'Acm F6 (Immunotech, France) est un anticorps monoclonal murin anti-ACE stocké à 4°C depuis 1999. Les résultats des électrophorèses de contrôle montrent qu'il n'a pas été dégradé au cours du temps et peut être utilisé.

L'Acm 679 (Immunotech, France) est un anticorps monoclonal murin anti-HSG. Comme pour l'Acm F6, une confirmation de son intégrité a été réalisée préalablement par électrophorèse.

### I.B Matériels

#### I.B.1 Chromatographie liquide

La chromatographie liquide est la technique de contrôle et de purification pour toutes les étapes de la synthèse de l'AcBs. Les colonnes sont constituées d'une matrice gel d'agarose et

### **Matériels et méthodes – Matériels**

de dextrose. Deux systèmes chromatographiques sont utilisés et dépendent de la quantité de produit injecté : soit une chaîne CLHP analytique (pompe, injecteur et détecteur UV, Waters, USA) avec une colonne Superdex® G200 (GE Healthcare, USA) pour les quantités de produits inférieures à 1 mg, soit une chaîne FPLC préparative (chromatographie liquide à performance rapide) (Fast Performance Liquid Chromatography, GE Healthcare) avec une colonne Hiloal 26/60 Superdex® G200 (GE Healthcare, USA) pour les quantités supérieures à 1 mg. Les différents produits sont séparés par leur taille en utilisant une technique de chromatographie d'exclusion stérique optimale pour les poids moléculaires compris entre 10 kDa et 600 kDa. Ils sont détectés par spectrométrie UV à 280 nm. Le solvant d'élution est du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,2. Le débit est de 0,8 mL / min en condition isocratique. Lorsque le système est utilisé comme technique de purification, les solutions en sortie de colonne sont collectées par fractions de 0,5 mL à 1 mL dans des tubes à hémolyse en verre. Les différentes fractions des pics d'intérêt sont dosées et regroupées. Puis les produits sont contrôlés par électrophorèse en gel d'agarose et CLHP selon le même protocole.

### **I.B.2 Spectrométrie UV**

Les Ac sont des protéines et à ce titre, elles possèdent un maximal d'absorbance à 280 nm. Le spectromètre a donc été utilisé pour quantifier les solutions. La synthèse d'AcBs étant réalisée en plusieurs étapes, un contrôle des produits intermédiaires formés a été réalisé. Certaines solutions sont peu concentrées (environ 300 µg / mL) ce qui peut entraîner une incertitude dans la mesure. Pour limiter ce phénomène, les échantillons ont été analysés en duplicats. La technique de référence du laboratoire utilise un spectromètre UV - visible Biophotometer® (Eppendorf, USA). Le volume nécessaire pour l'analyse est de 50 µL. Pour réduire le volume d'échantillon, un second appareil a été proposé. Il s'agit d'un Nanodrop® (ThermoFischer, USA). Le volume nécessaire pour l'analyse est très faible de 2 µL.

### **I.B.3 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide**

Afin de contrôler les AcM et vérifier les différents produits formés durant les étapes de synthèse de l'AcBs, des gels de polyacrylamide à 6 % et 12 % sont réalisés après la synthèse. Le gel à 6 % permet de contrôler le produit en condition non dénaturante et non réductrice (sans clivage des ponts disulfures) alors que le gel à 12 % est utilisé en conditions

### **Matériels et méthodes – Matériels**

dénaturantes et réductrices (par chauffage des échantillons et ajout de  $\beta$  mercapto-éthanol). Afin de normaliser la migration des produits dans le gel, un gel stack à 5 % de polyacrylamide est polymérisé au dessus du gel de migration. Les gels sont immergés dans une solution de migration (Glycine, Tris Base, SDS 1 %)

Les échantillons contrôlés sont issus de toutes les étapes de la synthèse et conservés à 4 °C. Après dosage à 280 nm, 5 à 10  $\mu$ g de protéines sont mélangées au tampon de lyse (Tris 1M pH 6,8, glycérol, SDS 20%, bleu de bromophénol 1% avec ou sans  $\beta$  mercapto-éthanol). Puis les échantillons en condition réductrices et dénaturantes sont chauffés à 100°C pendant 2 min.

L'ensemble des échantillons et le marqueur de poids (*Precision Plus Protein Standards, BioRad®*, All Blue 250kDa – 10kDa, Biorad, USA) sont déposés dans les puits moulés dans le gel stack. La tension du courant électrique appliquée est de 200 V. Le temps de migration est dépendant du comportement de migration des échantillons déposés.

Après migration, la révélation des produits s'effectue par la mise en bain des gels dans un colorant (éthanol, acide acétique, bleu de coomassie) durant plusieurs heures puis dans un bain de décoloration (éthanol, acide acétique glacial, eau) afin que seules les bandes de produits soient apparentes.

Les échantillons sont ensuite identifiés selon leur poids en prenant comme référence l'échelle de poids. En conditions non réductrices et non dénaturantes, une bande à 150 kDa correspond aux AcM entiers. Les  $F(ab')_2$  sont identifiés à 100 kDa et les Fab' à 50 kDa. Les AcBs dont le poids est de 100 kDa sont au même niveau de migration que les  $F(ab')_2$ . En conditions réductrices et dénaturantes, l'AcM est clivé en une bande migrant à 25 kDa (chaînes L) et une bande à 50 kDa (chaînes H non digérées), les  $F(ab')_2$  et les Fab' sont totalement clivés et migrent à 25 kDa (chaînes L et H digérées). Les AcBs ne sont pas totalement réduits par l'action du  $\beta$  mercapto-éthanol. A l'inverse des  $F(ab')_2$ , les deux chaînes H restent associées par des liaisons covalentes au niveau de leur région charnière. De ce fait, l'AcBs migre en deux bandes au poids moléculaire de 25 kDa et 50 kDa.

## **I.C Méthodes**

### **I.C.1 Comparaison des techniques de dosage par spectrométrie UV**

Les échantillons étant faiblement concentrés, une étude comparative des deux appareils de mesure a été effectuée. Celle-ci a pour but de valider le Nanodrop® comme nouvel appareil de référence. Des solutions d'albumine provenant de séra bovins (BSA pour *Bovine Serum Albumin*), de pepsine, d'Acm HLL<sub>2</sub>, de F(ab')<sub>2</sub> (HLL<sub>2</sub>) et de Fab' (HLL<sub>2</sub>) de 1 mg /mL ont été diluées successivement par du tampon phosphate de sodium 0,1 M afin d'obtenir une gamme de concentrations de 1 mg / mL, 0,75 mg / mL, 0,50 mg/ mL, 0,25 mg / mL et un blanc composé uniquement de tampon phosphate. La mesure de chaque point de la gamme a été réalisée en triplicats pour le Nanodrop® afin de contrôler la variabilité de la mesure. Les échantillons sont mesurés par spectrométrie UV à 280 nm. Une corrélation entre les deux méthodes a ensuite été effectuée.

### **I.C.2 Production des anticorps bispécifiques**

La synthèse d'AcBs demande plusieurs étapes qui sont détaillées dans le protocole suivant. Après chaque étape, un dosage de la quantité de produit obtenu est réalisé par spectrométrie UV à 280 nm puis le rendement de la réaction est calculé par le rapport de la masse obtenue sur la masse d'Acm utilisée au départ.

#### **I.C.2.a *Fragilisation des anticorps***

Pour améliorer l'action de la pepsine, une fragilisation préalable de certains anticorps est nécessaire. L'Acm est mis en tampon formiate 10 mM pH 2,8 par des ultracentrifugations sur membrane à 2000 g en utilisant des Amicon® 4 mL (Millipore, Allemagne, limite de rétention du filtre à 30 kDa). L'ultrafiltrat est incubé à TA pendant 2 à 3 h. Le solvant est ensuite remplacé par du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,2 à l'aide de la même technique. Chaque changement de tampon entraînant une modification du pH, celui-ci est contrôlé par papier pH.

### **I.C.2.b Digestion pepsique des anticorps**

Les Ac sont digérés par méthode enzymatique grâce à l'action de la pepsine qui clive en milieu acide l'Ac en une partie  $F(ab')_2$  et dégrade la partie Fc (cf fig 1.). La pepsine est une endoprotéase qui hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles un acide aminé aromatique (Y, W, F) engage sa fonction amine. Dans la digestion d'anticorps, l'enzyme cible les aa situés en dessous des ponts disulfures structurels de l'anticorps. L'enzyme est active à un pH inférieur à 5 et à 37°C.

La quantité d'Acm digérés est variable et déterminée selon les besoins. Cependant avec notre technique, la masse d'Acm ne dépasse jamais 5 mg pour éviter une saturation des filtres des Amicons® lors des changements de tampons. La solution d'Acm est mise en tampon acétate 50 mM pH 4,2 par des centrifugations successives à 2000 g. La solution mère de pepsine (10 mg / mL, CAS : 9001-75-6, Sigma, USA) et la solution d'Acm sont chauffées séparément à 37°C durant 10 min. Puis une quantité de 10 % (p/p de l'Acm) de la solution de pepsine est ajoutée et le mélange est incubé durant 15 min à 37°C au bain marie. Après un contrôle de la digestion par CLHP, l'action de la pepsine est arrêtée par l'augmentation du pH à 7 grâce à l'ajout d'HEPES 1 M pH 8.

La digestion n'est jamais totale, les  $F(ab')_2$  sont donc purifiés des autres produits formés et des Ac non digérés par CLHP en utilisant la technique de chromatographie d'exclusion. Puis les fractions sont dosées par spectrométrie UV à 280 nm et le rendement de l'étape est calculé.

### **I.C.2.c Réduction des $F(ab')_2$ en Fab'**

La séparation des 2 parties Fab' est réalisée par la réduction des ponts disulfures présents dans la région charnière du  $F(ab')_2$ . La technique de réduction a été testée avec deux réducteurs : la cystéamine qui est la méthode de référence et le dithiothréitol. Afin de comparer les deux réducteurs, les conditions d'expérience sont les mêmes.

La cystéamine est un réducteur considéré comme doux. Son action est catalysée avec l'élévation de la température. La molécule est sensible à la lumière et la solution sera donc préparée extemporanément. La solution mère de 1 M est préparée en tampon phosphate 0,1 M pH 7,4. La concentration finale de cystéamine dans la solution de  $F(ab')_2$  est de 1 mM.

**Matériels et méthodes – Méthodes – Production des anticorps bispécifiques**

Le dithiothréitol (DTT) est un réducteur fort. Il est largement utilisé en biochimie pour prévenir l'oxydation des cystéines. Son action s'exerce surtout au-delà de pH 7. Le DTT est peu stable en solution notamment parce qu'il s'oxyde facilement à la lumière. Lors de son utilisation, une protection contre celle-ci est obligatoire. La solution de DTT est donc réalisée extemporanément. La solution mère est préparée en eau/chélex à la concentration de 12mM. La concentration finale dans la solution de F(ab')<sub>2</sub> à réduire est de 2 mM.

La solution de F(ab')<sub>2</sub>, collectée au pic chromatographique correspondant, possède un volume supérieur à 2 mL. Avant d'être réduit, il est donc concentré par ultracentrifugation à 2000 g grâce à un système Amikon. La concentration de la solution de F(ab')<sub>2</sub> ne doit pas dépasser 10 mg / mL, elle permet essentiellement de limiter le volume de réducteur à ajouter. Puis un volume de 8 µL d'EDTA 0,5 M pH 8 est ajouté à la solution de F(ab')<sub>2</sub> complété à 495 µL par du tampon phosphate 0,1 M pH 7,2. L'ajout d'EDTA est indispensable car ce chélatant séquestre les ions métalliques, présents dans la solution, dont l'action oxydante pourrait entraîner la réassociation des fonctions thiols entre elles. Enfin, un volume de 83 µL de DTT ou de 5 µL de cystéamine est ajoutée à la solution de F(ab')<sub>2</sub>. Le mélange est incubé pendant une durée de 30 min à 1h à 37°C.

La réduction totale est contrôlée par CLHP puis la purification est réalisée soit par une colonne de dessalage PD-10® (Amersham Biosciences), soit directement par CLHP. En PD-10®, les Fab' sont élués par une solution tampon d'acétate-EDTA (50 mM – 0,5 mM) pH 5,3. Préalablement pour saturer les sites de liaisons aspécifiques de la PD-10®, la colonne est incubée en solution tampon acétate-BSA (50 mM-0,5%) pH 5,3 durant 30 min puis rincée. La récolte est réalisée par fractions de 0,7 mL avec une solution d'acétate-EDTA (50 mM – 0,5 mM) pH 5,3. Les fractions sont dosées par spectrométrie UV à 280 nm au Nanodrop et celles correspondant aux Fab' sont réunies. Comme précédemment, le rendement de l'étape est calculé.

Pour la purification par CLHP, le protocole est le même que précédemment. Succinctement, une colonne gel-filtration Superdex® G200 est éluee par le tampon phosphate à un débit de 0,8 mL / min durant 30 min. Le pic correspondant aux Fab' est récolté par un tube à hémolyse, puis le produit est dosé et le rendement de production calculé.

### Matériels et méthodes – Méthodes – Production des anticorps bispécifiques

Il est important de noter que pour limiter la réassociation des Fab', la solution doit être immédiatement utilisée dans la suite du protocole. Aucune concentration du produit n'est possible. La purification par CLHP, dont les solutions recueillies sont extrêmement diluées, ne peut donc pas être utilisée car elle demande une concentration de la solution de Fab' par ultracentrifugation. De ce fait, la purification des Fab' est réalisée uniquement par la colonne de dessalage. Les solutions produites sont donc toutes en tampon acétate-EDTA (50 mM – 0,5 mM) pH 5,3. Les concentrations de ces solutions dépendent de la quantité de Fab' produit. Le volume de la solution est le plus souvent de 1,4 mL.

#### I.C.2.d Synthèse de l'anticorps bispécifique

La méthode présentée dans la suite de ce protocole est la méthode proposée par l'équipe. Une optimisation de ce protocole a été par la suite proposée et sera présenté dans le chapitre « résultat » de ce travail.

#### Conjugaison de la solution A de Fab' avec le PDM

L'AcBs est formé par la réunion de 2 parties Fab' dont l'une a été préalablement fonctionnalisée par l'ajout de PDM (PDM pour *N,N'*-(*o*-phénylène)dimaléimide, fig.34). Le PDM (numéro CAS 13118-04-2, Sigma) est une molécule réactive qui réagit avec les fonctions thiols des cystéines et permet la conjugaison de 2 Fab'.

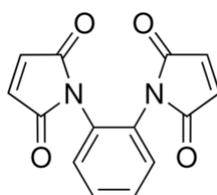


Figure 34. Représentation schématique du *N,N'*-(*o*-phénylène)dimaléimide (Sigma)

A la solution 1 purifiée de Fab' obtenue précédemment sont ajouté 500  $\mu$ L de la solution de couplage PDM 20 mM diluée dans le diméthylformamide (excès de PDM compris entre 100 et 500). Pour éviter une dégradation des Fab', la quantité finale de diméthylformamide ne doit pas excéder 20 %. L'incubation est de minimum 1 h à TA.

Puis le produit Fab'-PDM est purifié par une colonne de dessalage PD-10® (Amersham Biosciences) en solution acétate-EDTA (50 mM – 0,5 mM) pH 5,3. Préalablement, pour

### **Matériels et méthodes – Méthodes – Production des anticorps bispécifiques**

saturer les sites de liaison aspécifique des Fab', la colonne est préconditionnée en solution tampon acétate - BSA (50 mM - 0,5%) pH 5,3 durant 30 min. La récolte est réalisée par fractions de 0,7 mL avec une solution d'acétate-EDTA (50 mM – 0,5 mM) pH 5,3. Les fractions sont dosées par spectrométrie UV à 280 nm et celles correspondant aux Fab'-PDM sont réunies. Le rendement de l'étape est calculé.

#### **Formation de l'anticorps bispécifique**

La solution 1 contenant le Fab'-PDM est mélangée à la solution 2 de Fab'. Les quantités de Fab' mélangés doivent être équimolaires. Puis, le mélange est concentré sur Amicon® par ultracentrifugations successives pour que le volume final n'excède pas 500µL. Il est ensuite mis à incuber durant une nuit à 4°C en solution tampon acétate-EDTA (50 mM – 0,5 mM) pH 5,3.

#### **Purification de l'anticorps bispécifique**

L'AcBs formé doit ensuite être purifié. La liaison des fonctions thiols avec le PDM est résistante à la réduction par la cystéamine, ce qui n'est pas le cas des liaisons disulfures qui auraient pu se reformer durant l'incubation.

Une solution de cystéamine 20 mM finale (solution mère à 1 M) est ajoutée à la solution de AcBs et laissée incuber 1 h à TA. Enfin pour éviter toute réassociation ultérieure, un volume de 10 µL d'une solution de NEM 1 M (NEM pour *N*-éthylmaléimide, CAS 128-53-0, Sigma, USA) est ajoutée et bloque les fonctions thiol libres. La concentration finale de NEM est de 20 mM. Une nouvelle incubation de 30 min est nécessaire à TA. Puis la solution est purifiée par CLHP. Le rendement de l'ensemble de la synthèse est alors calculé. Des contrôles par CLHP et par électrophorèse sont également réalisés.

### **I.C.3 Études d'affinités**

#### **I.C.3.a Dosage radio-immunologique**

L'immunoréactivité de l'AcBs synthétisé est analysée à l'aide d'un dosage radio-immunologique direct à l'iode-125. La technique repose sur l'utilisation d'Ag immobilisés sur une phase solide. Dans notre cas, la phase solide est un tube Maxisorp® traité (Tube Maxisorp® de 5 mL, Nunc, USA) dont les parois sont recouvertes d'Ag. Deux dosages sont nécessaires pour vérifier l'intégrité de reconnaissance des versants après la synthèse de l'AcBs. Pour le versant F6, l'Ag fixé est l'Acm 44.12.13, Ac anti-idiotype de l'Acm F6. Cet Acm reconnaît les régions hypervariables du F6. Pour le versant 679, l'Ag fixé est l'haptène divalent IMP-325 possédant deux séquences HSG reconnues par l'Acm 679.

#### **Radiomarquage de l'AcBs à l'<sup>125</sup>I**

Pour limiter la dispersion aérienne de l'<sup>125</sup>I, toutes les manipulations sont réalisées dans une enceinte ayant une extraction d'air adaptée. Les vecteurs sont radiomarqués par une technique d'iodation directe en utilisant l'iodogène (1,3,4,6-tetrachloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diphenylglucuril), oxydant doux dont une quantité de 10  $\mu$ g est adsorbée à la surface de tube Maxisorp®. Une quantité de 20  $\mu$ g de vecteurs (concentration de la solution à 500  $\mu$ g / mL), dont le volume est complété à 100  $\mu$ L par du tampon phosphate 0,1 M, est mise à incuber avec une activité de 370 kBq d'<sup>125</sup>I durant 20 min à TA dans les tubes contenant l'iodogène. Puis la solution de vecteurs radiomarqués est transvasée dans un tube propre en verre pour bloquer la réaction. Le radiomarquage est contrôlé.

#### **Contrôle du radiomarquage**

La technique de contrôle est une chromatographie sur couche mince. Un dépôt de 2  $\mu$ L de la solution est réalisé sur une plaque ITLC-SG (plaque de silice greffée, Agilent, USA). Puis, la plaque est déposée dans un volume de 3 mL d'acide trichloroacétique 10 % (v / v). Dans ces conditions, l'AcBs radiomarqué a un rapport frontal (Rf) de 0 et l'<sup>125</sup>I libre de 1. Après migration du solvant, la plaque est coupée en deux parties égales et la radioactivité de chaque partie est comptée au compteur  $\gamma$ . Le radiomarquage est validé si au minimum 90 % de la radioactivité totale est retrouvée dans la partie où a été effectué le dépôt (Rf = 0).

### **Détermination de l'immunoréactivité du vecteur**

L'AcBs radiomarqué à l' $^{125}\text{I}$  est diluée à la concentration de 500 à 1000 Bq / mL par une solution de tampon phosphate 0,1 M / BSA 0,5 % (p / v) pH 7,2. Puis un volume de 500  $\mu\text{L}$  de cette solution est déposé dans les tubes où est fixée une quantité de 10  $\mu\text{g}$  d'Ag. La solution est incubée 1 h à 37°C. Puis l'activité des tubes pleins est comptée au compteur  $\gamma$ . La solution est éliminée et les tubes sont rincés deux fois avec 750  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate 0,1 M / tween 0,1 % (v / v). Puis les tubes vides sont comptés au compteur  $\gamma$ . L'immunoréactivité du versant de l'AcBs pour son Ag est le pourcentage du rapport des activités des tubes vides sur les tubes pleins. L'expérience est réalisée en duplicats pour limiter les variations. L'activité n'est pas corrigée de la décroissance car l' $^{125}\text{I}$  possède une période physique longue de 59 jours.

#### **I.C.3.b Titration par calorimétrie isotherme**

La titration par calorimétrie isotherme est une technique récente qui repose sur la mesure des variations de température dans un système. Lorsqu'un ligand se fixe sur un récepteur, la réaction s'accompagne d'une libération ou d'une absorption de chaleur. Ces variations sont mesurées par des microcalorimètres. Le principe repose sur l'ajout de petites quantités de ligand à une solution de protéines. La chaleur dégagée ou absorbée lors de la réaction de fixation est compensée pour maintenir la température constante dans le système. Puis les différentes grandeurs thermodynamiques sont calculées et la constante d'équilibre est obtenue.

Dans notre étude, l'affinité du versant 679 de l'AcBs pour l'haptène di-HSGL a été évaluée par l'étude des variations de température du système contenant 400  $\mu\text{L}$  d'une solution d'AcBs à 5  $\mu\text{M}$  dans laquelle sont ajoutées des petites quantités de l'haptène monovalent HSGL. Le nombre de sites reconnaissant l'Ag a également été calculé. Succinctement, un volume de 2  $\mu\text{L}$  d'HSGL (de concentration 100  $\mu\text{M}$ ) a été ajouté sous agitation à 1000 rpm toutes les 150 s durant 50 min (soit 20 répétitions). La référence est de 6  $\mu\text{cal}$  / s. Le milieu réactionnel est thermostaté à 25°C.

## **I.D Analyses statistiques**

Les variables quantitatives ont été décrites à l'aide de la moyenne et de l'écart-type. Pour les groupes de taille faible ( $n \leq 7$ ) qui ne garantissent pas une distribution normale, des tests non-paramétriques ont été utilisés. Les comparaisons des moyennes en inter-groupes ont été effectuées à l'aide des tests de Mann-Whitney. Le seuil de significativité est fixé conventionnellement à 5 % ( $p < 0,05$ ). Pour les groupes de taille suffisante pour garantir une distribution normale, un t-test de Student de comparaison des moyennes en inter-groupe a été utilisé. Comme précédemment, le seuil de significativité est fixé conventionnellement à 5 % ( $p < 0,05$ ).

## **II Résultats**

La formation d'AcBs par voie chimique aboutit à la synthèse d'un vecteur possédant les caractéristiques pharmacocinétiques d'un  $F(ab')_2$ . Sa particularité est qu'il est formé par deux parties Fab' ne reconnaissant pas la même cible et assemblées par des liaisons covalentes résistantes aux enzymes plasmatiques. La description de la méthode de synthèse a été présentée en 1989 par l'équipe de Le Doussal (145). Dans notre travail, nous avons tout d'abord voulu valider la technique avec un Acm humanisé pour vérifier que les parties Fab' humanisées réagissaient de la même manière que les Fab' murins. L'AcBs humanisé était formé de deux parties Fab' reconnaissant toutes les deux l'antigène CD-22. Il devait être la preuve de concept que l'humanisation des AcBs par cette technique était réalisable. L'Acm HLL<sub>2</sub> a été utilisé comme matière première. Plusieurs optimisations ont été nécessaires pour adapter la technique à cet Acm.

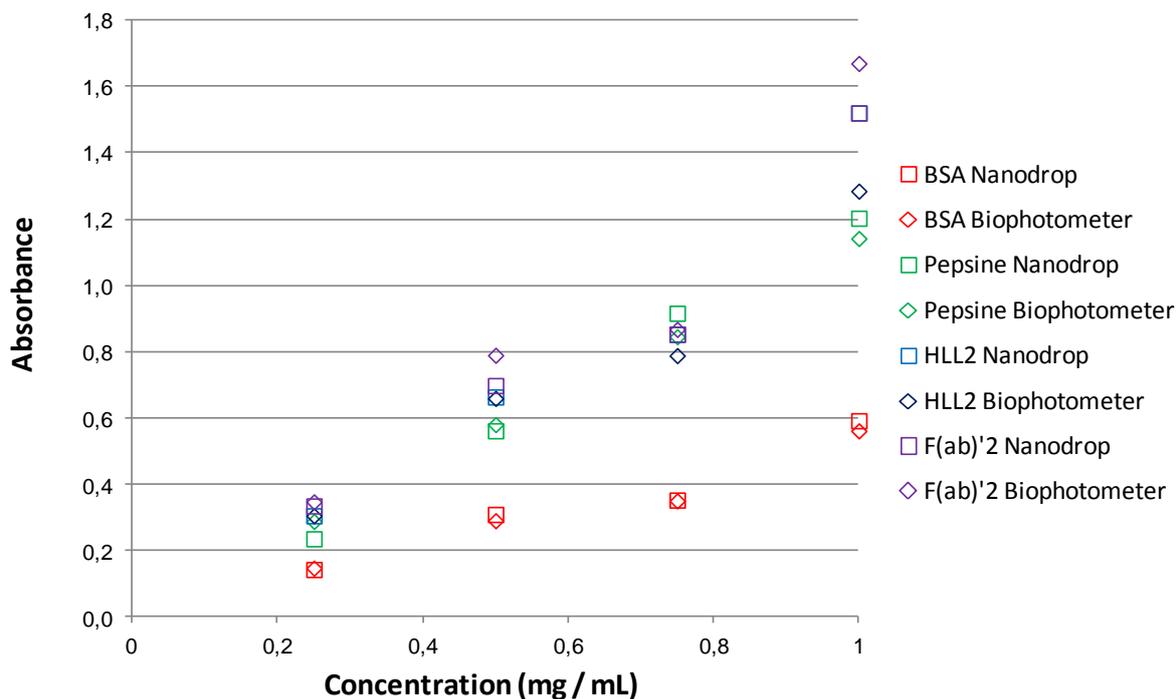
Dans un second temps, l'AcBs F6 x 679 a été synthétisé pour valider *in vivo* le système avec le nouvel haptène di-HSGL radiomarké avec le <sup>68</sup>Ga. Cet AcBs murin a déjà fait l'objet de publications en imagerie et sa technique de synthèse est validée. Cependant dans notre étude, les quantités d'Acm utilisées étaient beaucoup plus faibles et de ce fait, une optimisation de la technique a également été proposée.

### **II.A Validation de la technique de dosage par spectrométrie**

#### **UV**

Chaque étape de la synthèse doit être contrôlée par une analyse chromatographique. Le produit doit également être dosé par spectrométrie UV à 280 nm pour calculer le rendement de production. La technique par Nanodrop® possède l'avantage de nécessiter un très faible volume de solution pour le dosage. Elle a donc été comparée à la méthode de référence avec le spectromètre Biophotometer® dans le but de le remplacer lors des mesures. Plusieurs protéines ont été dosées avec les deux appareils en spectrométrie UV à 280 nm. Les concentrations des gammes ont été choisies pour correspondre à la zone de valeurs des concentrations des différents produits de synthèse.

Les résultats des dosages sont présentés figure 35.

**Résultats – Validation de la technique de dosage par spectrométrie UV**

**Figure 35. Graphique des absorbances à 280 nm des gammes de concentration de la BSA, de la pepsine, l'Acm HLL<sub>2</sub> et le F(ab')<sub>2</sub> HLL<sub>2</sub> en fonction de l'appareil de mesure**

Les mesures d'absorbances pour la BSA et la pepsine sont très proches entre les deux appareils pour tous les points de la gamme. Les coefficients de corrélation sont de  $R^2 = 0,999$  ( $p < 0,001$ ) pour la BSA et  $R^2 = 0,997$  ( $p = 0,002$ ) pour la pepsine.

Pour l'Acm et le F(ab')<sub>2</sub>, les mesures d'absorbances varient pour des valeurs de concentrations hautes. Les corrélations restent cependant très élevées avec des coefficients de corrélation  $R^2 = 0,993$  ( $p = 0,003$ ) pour l'Acm HLL<sub>2</sub> et  $R^2 = 0,998$  ( $p = 0,001$ ) pour le F(ab')<sub>2</sub>.

Le volume prélevé pour la mesure au Nanodrop® est de 2 µL. Ce volume est très faible et pour contrôler que des variations liées aux prélèvements n'induisent pas une erreur importante dans la mesure, une répétition pour chaque point des gammes a été réalisée. Les écarts-types sont faibles, la reproductibilité des mesures est très bonne à 98,6 % ± 0,85 %.

**La forte corrélation entre les deux techniques de dosage et la très bonne reproductibilité des mesures ont donc permis de valider le Nanodrop® comme outil de référence pour le dosage des produits par spectrométrie UV.**

## **II.B Production des AcBs**

### **II.B.1 Études sur la synthèse d’AcBs à partir d’Acm humanisés**

Afin de proposer des AcBs totalement humanisés et synthétisés par voie chimique, nous avons produit un AcBs à partir de deux Fab’ humanisés issu de l’Acm humanisé HLL<sub>2</sub>. Toutes les étapes de la production ont été étudiées afin de démontrer que les Acm humanisés sont des matières premières utilisables pour la synthèse par voie chimique d’AcBs totalement humanisé.

#### **II.B.1.a Études sur la digestion de l’HLL<sub>2</sub> par la pepsine**

Les anticorps monoclonaux d’une même origine ont tous des structures semblables mais du fait de leur conformation quaternaire, ils ne possèdent pas tous la même sensibilité à l’action de la pepsine. La digestion peut être plus lente si l’enzyme atteint difficilement sa cible. L’HLL<sub>2</sub> est un Acm humanisé dont la digestion pepsique n’a jamais été testée.

Dans un premier temps, la digestion de l’Acm préalablement fragilisé a été réalisée avec une augmentation croissante des quantités de pepsine : 1 %, 2,5 %, 5 % ou 10% (p / p). Les résultats des rendements pour les différentes conditions sont présentés dans le tableau 13.

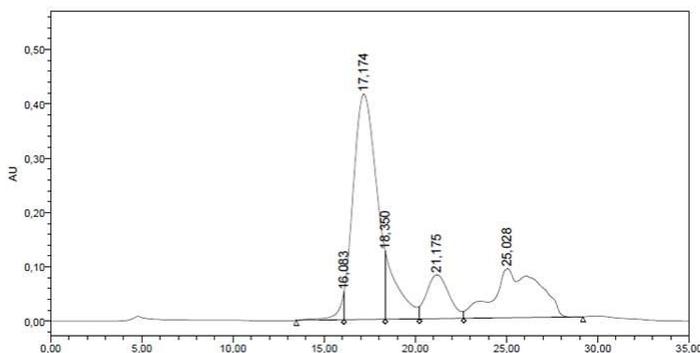
<b>Quantité de pepsine (% , p / p)</b>	<b>Rendement de digestion (%)</b>
<b>1</b>	29,5
<b>2,5</b>	27,2
<b>5</b>	43,9
<b>7,5</b>	39,5
<b>10</b>	37,9

**Tableau 13. Rendements de digestion de l’HLL<sub>2</sub> selon la quantité de pepsine**

Les rendements de digestion sont faibles pour des quantités de pepsine à 1 % ou 2,5 %. Ils sont similaires pour une quantité de pepsine à 5 %, 7,5 % et 10 %. Cependant, les chromatogrammes présentent des différences marquantes sur ces 3 derniers résultats. Comme le montre la figure 36, le pourcentage de la surface du pic de F(ab’)<sub>2</sub> au temps de rétention T<sub>r</sub> = 17,1 min est plus faible pour une quantité de pepsine à 7,5 % et 10 % (p / p) et

**Résultats – Production des anticorps bispécifiques – Synthèse d’AcBs à partir d’Acm humanisés**

les surfaces des pics a  $T_r = 21$  min et 25 min correspondant à des produits de dégradation sont plus importantes. Ce profil caractérise une action trop importante de la pepsine qui forme des produits de dégradation de l’Acm de poids inférieurs au  $F(ab')_2$ .



Quantité de pepsine (%)	Pourcentage de surface du pic de $F(ab')_2$ (%)
5	54,7
7,5	45,2
10	44,5

**Figure 36. Profil chromatographique des produits de l’HLL<sub>2</sub> digérés par 5 % de pepsine**

Suite à ces résultats, la digestion de l’HLL<sub>2</sub> par la pepsine est réalisée avec une quantité d’enzyme de 5 % (p / p).

Pour évaluer l’impact de la fragilisation et des temps de digestion sur les Acm humanisés, une étude a été réalisée.

L’Acm est digéré durant 15 min, 30 min, 45 min, 60 min et 90 min avec ou sans une étape de fragilisation préalable. Les pourcentages de surface des différents pics de chromatographie ont été calculés et sont présentés dans le tableau 14.

Temps d’incubation (min)	Pourcentage de la surface du pic de $F(ab')_2$ avec fragilisation (%)	Pourcentage de la surface du pic de $F(ab')_2$ sans fragilisation (%)
15	43,6	56,8
30	38,5	56,0
45	35,5	52,6
60	38,1	52,8
90	38,0	50,1

**Tableau 14. Comparaison des surfaces des pics de  $F(ab')_2$  avec et sans fragilisation**

### Résultats – Production des anticorps bispécifiques – Synthèse d'AcBs à partir d'Acm humanisés

La fragilisation diminue nettement le pourcentage relatif du pic des  $F(ab')_2$  par rapport aux autres pics. Elle n'est donc pas favorable pour la digestion de cet Acm.

Sans fragilisation, les temps d'incubation supérieurs à 30 min entraînent la formation importante de produits de dégradation. Les résultats sont similaires pour des temps de 15 min et de 30 min.

**Les résultats montrent que l'Acm non fragilisé est digéré de façon optimale par 5 % de pepsine pendant une durée de 30 min.**

#### II.B.1.b Comparaison des réducteurs pour la formation des Fab'

Toujours dans l'optique de produire un AcBs totalement humanisé d'une part et pour améliorer les rendements de production des Fab' d'autre part, le réducteur de référence, la cystéamine, a été comparé au DTT dont l'action est considérée comme plus forte. Les réducteurs ont été mis en contact avec le  $F(ab')_2$  issu de l'Acm HLL<sub>2</sub> dont les quantités variaient de 0,75 mg à 2,50 mg pour les deux techniques. Les résultats sont présentés dans le tableau 15.

	moyenne des rendements de production (%)	écart-types des rendements de production(%)
DTT (n = 8)	46,22	16,22
Cystéamine (n = 5)	70,62	14,80

**Tableau 15. Rendements de production des Fab' de l'HLL<sub>2</sub> en fonction du réducteur**

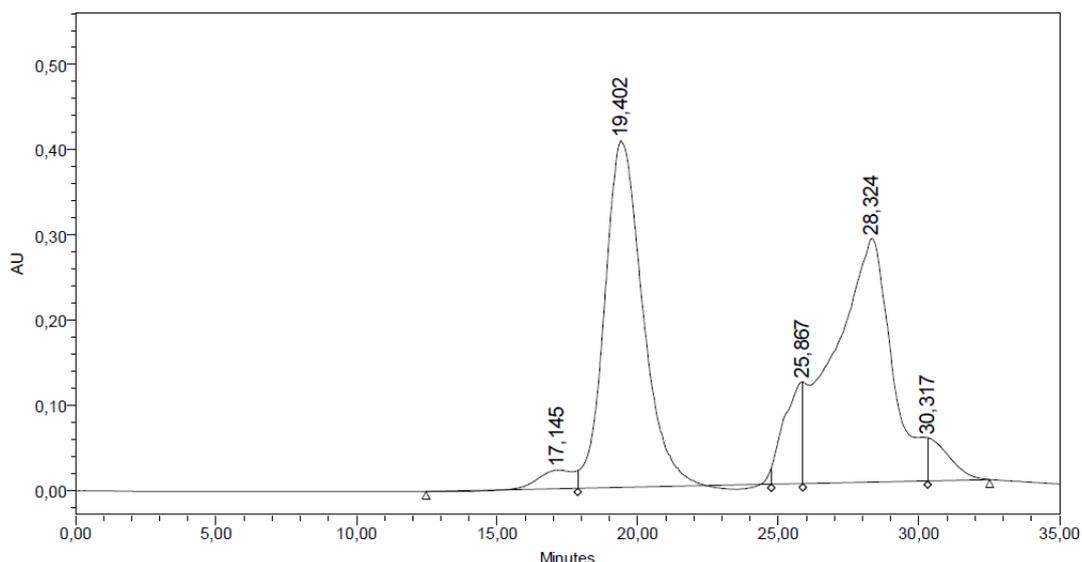
Une comparaison des résultats montre que la production de Fab' est significativement plus haute pour la réduction par la cystéamine que pour la réduction par le DTT ( $p = 0,018$ ).

**La cystéamine est donc confirmée comme le réducteur optimal pour l'étape de production des Fab' issus d'un Acm humanisé.**

### II.B.1.c Formation des AcBs : production du $HLL_2 \times HLL_2$

N'ayant encore jamais été décrit dans la littérature, la formation par voie chimique de AcBs totalement humanisés a été testée avec des Fab' tous deux issus de l'Acm  $HLL_2$ .

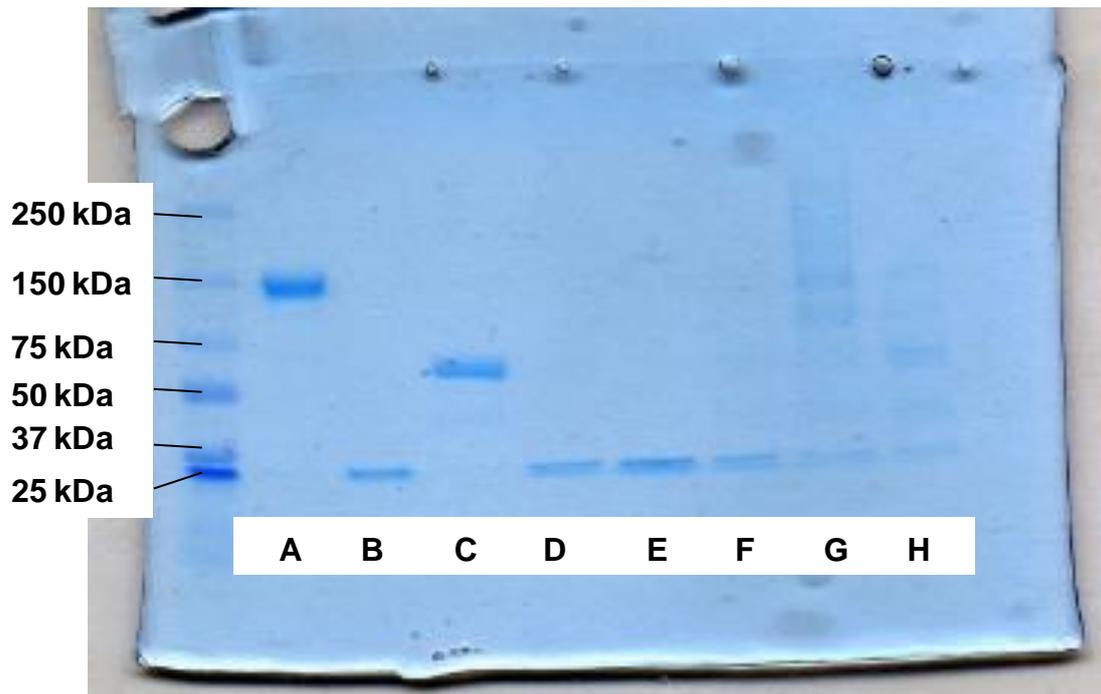
Comme présenté dans la partie « méthode », une partie des Fab' était conjuguée avec le PDM puis une association avec des Fab' était attendue. Cependant, lors des essais, aucune formation d'AcBs n'a pu être mise en évidence. Comme le présente la figure 37, la majorité des produits formés correspond d'après le profil chromatographique à du Fab'-NEM synthétisé lors de la dernière étape de couplage des fonctions thiols restantes avec le NEM ( $T_r = 19,4$  min).



**Figure 37. Profil chromatographique d'une solution d'AcBs  $HLL_2 \times HLL_2$  non purifié**

Les pics visibles à des temps de rétention entre 25 min et 30 min correspondent aux produits de dégradation lors de la deuxième réduction par la cystéamine. Le pic à un temps de rétention  $T_r = 17,3$  min correspond à une multitude de produits séparés par électrophorèse en condition non réductrice et non dénaturante (fig.38).

**Résultats – Production des anticorps bispécifiques – Synthèse d'AcBs à partir d'Acm humanisés**



**Figure 38. Électrophorèse en condition non réductrice**

**A.** Acm HLL<sub>2</sub>. **B.** Fab' 1. **C.** F(ab')<sub>2</sub>. **D.** Fab'-NEM. **E.** Fab' 2. **F.** mélange des Fab'1 et 2. **G** et **H.** Échantillons récoltés au pic d'AcBs (T<sub>R</sub> = 17,3 min).

Les échantillons déposés dans les puits G et H sont normalement de l'AcBs purifié. En réalité, de très nombreux produits de réassociations sont présents. Ils possèdent tous des temps de rétention très proches en CLHP ce qui rend la purification irréalisable. Les différents essais se sont tous soldés par des échecs.

De ce fait, l'utilisation de l'HLL<sub>2</sub> comme matière première pour la formation d'AcBs a été abandonnée.

**L'ensemble des résultats de l'étude n'ont pas permis de valider la technique pour l'humanisation des AcBs. Une optimisation des phases de digestion pepsique et de réduction a cependant été réalisée pour l'Acm HLL<sub>2</sub>.**

## II.B.2 Production de l'AcBs murin F6 x 679 : Optimisation de la synthèse

Le deuxième AcBs produit fut le F6 x 679. La synthèse de cet AcBs par voie chimique était déjà décrite dans la littérature. Issu du protocole historique, l'équipe a adapté la méthode qui a servie de base à notre étude. Elle est détaillée dans la partie « matériels et méthodes ».

Le but de l'étude était de conserver des rendements de production obtenus précédemment tout en réduisant les quantités de matières premières, c'est-à-dire d'Acm ou de F(ab')<sub>2</sub>.

L'optimisation de la technique a été réalisée par la variation des pH lors de l'étape de couplage de la solution 1 de Fab' avec le PDM d'une part, et de conjugaison des deux Fab' d'autre part.

Deux types de tampons ont été utilisés : une solution tampon phosphate de sodium - EDTA (0,1 M - 0,5 mM) à pH 6,5 et une solution tampon acétate de sodium - EDTA (50mM – 0,5 mM) à pH 5,3. La solution 1 de Fab' 679 était incubée avec le PDM dans l'une ou l'autre des solutions tampons puis la formation de l'AcBs avec la solution 2 de Fab' F6 était réalisée dans l'une ou l'autre des solutions tampon. Les rendements des différentes productions sont présentés dans le tableau 16.

<b>pH de couplage avec PDM / pH de la solution lors formation de l'AcBs</b>	<b>Rendement (%)</b>
5,3 / 5,3 (n = 1)	29,72
6,5 / 6,5 (n = 3)	17,12 ± 7,04
5,3 / 6,5 (n= 2)	45,91 ± 8,99
6,5 / 5,3 (n = 1)	10,72

**Tableau 16. Résultats des essais de pH pour la formation des AcBs**

Les résultats montrent que le rendement de synthèse d'AcBs est nettement amélioré par un couplage du Fab' 679 avec le PDM en tampon acétate pH 5,3 puis par une conjugaison

**Résultats – Production des anticorps bispécifiques – Validation *in vitro* de l'AcBs F6 x 679 : Études sur l'immunoréactivité de l'AcBs**

des Fab'-PDM 679 et des Fab' F6 en tampon phosphate à pH 6,5. Les résultats obtenus sont similaires aux rendements précédemment obtenus par l'équipe.

**En conclusion, le protocole de synthèse, utilisant un pH à 5,3 pour l'étape de couplage du Fab' avec le PDM suivi d'un pH à 6,5 pour l'étape de conjugaison des deux versants Fab'-PDM et Fab', a été validée pour des petites quantités de matières premières.**

## **II.C Validation *in vitro* de l'AcBs F6 x 679**

### **II.C.1 Études sur l'immunoréactivité de l'AcBs**

Pour confirmer que la synthèse de l'AcBs n'a pas entraîné d'altération des sites de reconnaissance des deux versants, une étude d'immunoréactivité a été réalisée.

Les résultats montrent que l'immunoréactivité du versant F6 est de  $36,2 \% \pm 1,1 \%$  ( $n = 4$ ).

Pour le versant 679, l'immunoréactivité est quasi-nulle à  $1,4 \% \pm 0,4 \%$ . ( $n = 4$ ).

Une des hypothèses avancées pour ce dernier résultat a été que l'haptène est une molécule trop petite pour la méthode d'immunoréactivité. Son adsorption entraîne probablement le masquage de l'épitope le rendant indisponible pour la réaction d'interaction Ac-Ag.

Une autre technique, n'utilisant pas la phase solide pour la présentation de l'Ag, a donc été réalisée.

**Les résultats sur les immunoréactivités du versant F6 sont mitigés. Seulement 36,2 % des AcBs reconnaissent l'ACE ce qui apparait comme faible. D'autre part, les immunoréactivités avec des très petites molécules comme les haptènes ne semblent pas réalisables.**

### **II.C.2 Étude de reconnaissance du motif HSGL par le versant 679**

La titration par calorimétrie isotherme a donc été proposée car les études de liaison Ac-Ag sont réalisées en milieu liquide. De ce fait, cette technique est utilisable avec des molécules de petites tailles comme les haptènes. L'évaluation de l'intégrité du versant 679

**Résultats – Production des anticorps bispécifiques – Validation *in vitro* de l'AcBs F6 x 679 : Études sur l'immunoréactivité de l'AcBs**

pour le motif HSG a été complété par une mesure de l'affinité de l'AcBs pour l'haptène monovalent HSGL. L'affinité du versant 679 pour le nouvel haptène, synthétisé et breveté par l'équipe, était ainsi réalisée pour la première fois.

L'étude avait donc un double objectif :

- vérifier que le versant 679 reconnaissait correctement l'haptène monovalent
- mesurer l'affinité de l'AcBs pour l'haptène

Les mesures donnent une affinité de l'anticorps de  $7,14 \cdot 10^8 \pm 1,49 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$  (n = 20). Le pourcentage de sites reconnaissant l'AcBs est faible à  $27,7 \% \pm 0,02 \%$  (n = 20).

**L'affinité du versant 679 pour l'haptène HSGL est donc suffisante pour son utilisation dans le système AES. Cependant, le faible nombre de sites reconnaissant l'haptène laisse supposer que l'efficacité de ciblage ne sera pas optimale pour des quantités d'AcBs faibles.**

### **III Discussion**

#### **Humanisation des AcBs**

Les AcBs sont synthétisés par différentes techniques présentées au chapitre 1 de la revue bibliographique de ce manuscrit. L'humanisation totale des AcBs par voie chimique est une voie d'étude importante pour une utilisation clinique de ces vecteurs.

La synthèse chimique de l'AcBs requiert plusieurs étapes, dont la première étape est l'obtention de  $F(ab')_2$  par une digestion pepsique.

Comme l'ont montré les équipes de Rousseau et de Lamoyi, les différentes origines et sous-classes d'une Ig modifient l'efficacité d'action de la pepsine (288,289). L'utilisation de l'Acm humanisé HLL<sub>2</sub> pour la synthèse d'AcBs n'ayant jamais été décrite, une optimisation de cette première étape était donc nécessaire.

Les résultats sont intéressants : en effet, pour une même classe, les Acm humanisés semblent plus sensibles à la pepsine que les Acm murins comme l'Ac F6 ou l'Ac 679. Comme le montre les résultats de l'étude sur la digestion pepsique de l'Acm, l'étape de fragilisation entraîne une dégradation importante de l'Acm fragilisé. D'autre part, l'étude a mis en évidence qu'une quantité de pepsine plus faible était suffisante pour obtenir une quantité de  $F(ab')_2$  correct. Pour cette étape, les rendements de production sont moyens à environ 50 % de la quantité totale d'Acm. Il est intéressant de noter que la digestion est complète. Le rendement de production des  $F(ab')_2$  obtenu peut être expliqué par l'étape de purification par CLHP. En effet, celle-ci est difficile à mettre en œuvre car elle entraîne systématiquement une perte non négligeable de 10 à 15 % de la quantité de  $F(ab')_2$  formés.

En conclusion, l'étude a permis d'optimiser la digestion pepsique de l'HLL<sub>2</sub> et notamment de réduire le temps de 3 h à 1 h grâce à la suppression de l'étape de fragilisation.

L'étude sur l'étape de réduction a confirmé que la cystéamine, déjà utilisée comme réducteur dans les protocoles de synthèse des AcBs, était optimale pour la réduction des  $F(ab')_2$  HLL<sub>2</sub>. Il faut cependant noter que la méthode de purification des Fab' est différente d'une technique à l'autre. En effet, la purification, après la réduction par le DTT, était réalisée uniquement par CLHP alors que pour la réduction par cystéamine, une colonne de dessalage était utilisable. Cette différence est essentiellement liée aux différents produits

## Discussion

formés. En effet, la cystéamine qui est un réducteur doux, forme uniquement des Fab'. Le DTT, qui est un réducteur fort, produit différentes espèces dont les poids moléculaires sont similaires aux fab' et ne sont pas séparables par la colonne de dessalage. Dans ce cas, la purification par CLHP est obligatoire et elle entraîne une plus grande perte que celle réalisée par la colonne de dessalage. La différence observée dans les rendements de purification pourrait expliquer les différences observées entre les rendements de production des Fab'.

En conclusion, l'étude montre que les produits obtenus par la réduction au DTT sont plus variés que lors d'une réduction par la cystéamine. Il est donc préférable de réduire les F(ab')<sub>2</sub> par la cystéamine et de purifier les Fab' formés par une colonne de dessalage.

Lors de la synthèse, les étapes de couplage du PDM et de la conjugaison des Fab' sont les plus critiques. En effet, les Fab' sont des produits très réactifs qui se réassocient rapidement. Durant ces étapes, des réassociations sont donc toujours observées. De ce fait, une seconde réduction par la cystéamine suivi d'un couplage avec le NEM est réalisée systématiquement pour dissocier les Fab'-Fab' et former des Fa'-NEM non réactifs. Après cette étape, la purification de l'AcBs est réalisée par CLHP et le pic récolté doit contenir uniquement l'AcBs qui aura résisté à cette seconde réduction.

Lors de notre étude, le contrôle par électrophorèse montre que l'AcBs humanisé n'est pas pur. D'autres produits étaient également formés, notamment des Fab'-PDM x Fab'-PDM ou des complexes multivalents de poids moléculaires équivalents à 100 kDa. De plus, les produits majoritaires étaient des Fab'-NEM (> 90 % des produits récoltés).

Ces résultats montrent que la réaction d'association du Fab'-PDM avec le Fab' n'a pas eu lieu. Plusieurs hypothèses sont possibles. La première est que Fab' de l'HLL<sub>2</sub> ne possède pas de fonction thiols disponibles pour le couplage avec du PDM. Cette hypothèse est cependant peu probable car l'HLL<sub>2</sub> est un AcM humanisé IgG couplé avec la chaîne légère kappa de souris humanisée. De ce fait, sa structure présente des ponts disulfures. Une autre hypothèse est que le nombre de ponts disulfures présents est en nombres paires. Dans ce cas, les ponts se réassocient instantanément entre eux avant la conjugaison avec le PDM. Cette hypothèse est la plus probable. Dans la littérature, la formation d'AcBs par voie chimique a été uniquement réalisée avec des AcM d'origine murine ou chimérique. En effet, dans les années 80, les techniques d'humanisation des AcM étaient peu développées et seuls

## **Discussion**

les AcM d'origine murine ou chimérique étaient réellement disponibles. Plus récemment, l'équipe de Valerius a comparé différents AcBs ciblant un Ag tumoral et un récepteur des Fc activant l'ADCC (290). Dans cette étude, l'ensemble des AcM utilisés sont des Ac d'origine murine ou chimérique. A l'heure actuelle, aucune étude ne présente AcBs humanisés ou humains produit par une synthèse chimique.

Cette observation et les résultats obtenus durant notre étude doivent cependant nuancer l'hypothèse selon laquelle, la synthèse d'AcBs humain par voie chimique n'est pas réalisable. Il serait intéressant de tester une étape simultanée de couplage du PDM et de conjugaison des Fab'. Une nouvelle piste de travail serait de réaliser des essais avec différentes sous classes d'Ac humanisé afin de tester différentes structures d'Ac.

## **Optimisation de la production de l'AcBs F6 x 679**

La synthèse par voie chimique est une technique possédant de nombreuses étapes. Même pour un rendement d'étape de 100 %, une perte de produits est toujours observée notamment du fait de la réassociation des Fab' entre eux après la réduction du  $F(ab')_2$  mais également lors de la purification par CLHP. De ce fait, une quantité minimum d'AcM est nécessaire pour synthétiser un AcBs par cette technique.

Afin de réduire la quantité d'AcM a utilisée et produire des AcBs à la demande, notre étude a eu pour objectif d'optimiser la technique en ciblant les étapes critiques de la synthèse : le couplage avec le PDM et la conjugaison des Fab'.

La technique de référence proposée par l'équipe est issue des travaux de Glennie et al. (149). Cette technique propose la réduction des  $F(ab')_2$  par le  $\beta$ -mercaptoéthanol suivie de la réalisation des étapes de conjugaison du PDM et de la synthèse de l'AcBs en tampon acétate à pH 5,3. Toutes les étapes de purification sont réalisées par CLHP et impliquent une réduction des volumes par ultracentrifugation pour concentrer le produit purifié.

L'équipe a donc proposé des adaptations de la méthode pour la synthèse de ces AcBs. La première a été le changement de réducteur car le  $\beta$ -mercaptoéthanol est considéré comme un poison dont l'utilisation doit être limitée. Ce réducteur a donc été remplacé par la cystéamine moins toxique. La seconde a été la purification des Fab' par une colonne de dessalage, limitant la réassociation des Fab' entre eux. En effet, par ce système, la concentration de Fab' est plus importante et supprime l'étape d'ultracentrifugation.

## Discussion

En prenant comme référence ce protocole, nous avons proposé d'augmenter le rendement de formation du Fab'-PDM et du AcBs en faisant varier les pH lors de ces étapes. Cette proposition s'est appuyée sur les travaux de l'équipe de Smyth en 1964 qui ont montré que la réactivité des maléimides est forte pour des pH proches de la neutralité (entre 6,5 – 7,5) (291). Au-delà d'un pH 8, ils réagissent avec les amines. Leurs travaux portaient sur le NEM et étaient donc facilement transposables au PDM. De plus, ces travaux corroboraient les données de l'équipe notamment le choix du pH acide à 5,3 pour l'ensemble de la synthèse. En effet, le couplage du PDM avec les thiols de la région charnière n'est pas sélectif et à des pH proches de la neutralité, des maléimides sont susceptibles de réagir d'autres fonctions présentes sur le Fab'.

Nos résultats sont cohérents avec l'ensemble de ces travaux. Pour la réaction de couplage avec le PDM à un pH de 6,5, le rendement de synthèse des AcBs est fortement diminué. A ce pH, il est probable des produits possédant plusieurs PDM soient formés et que proportionnellement, le nombre de Fab'-PDM soit réduit.

Pour la réaction de conjugaison des Fab' à pH 6,5, la forte réactivité des PDM permet d'améliorer le nombre de Fab' qui réagissent et donc d'augmenter le rendement de synthèse des AcBs.

En conclusion, un maintien du pH à 5,3 pour la réaction de couplage du PDM et un passage à pH 6,5 pour la conjugaison des Fab' optimise la synthèse des AcBs.

Bien que la technique optimisée donne des rendements de synthèses comparables avec les résultats précédents de l'équipe (environ 40 %), les études d'intégrité des versants F6 et 679 sont décevantes. Les résultats obtenus ne sont pas corrélés avec les précédentes études réalisées. En effet, les AcBs préalablement formés par la technique de Glennie notamment l'AcBs F6 x 734 reconnaissant l'ACE et un haptène di- DTPA complexé à l'In et l'AcBs F6 x 679 possédaient des immunoréactivités supérieures à 70 % pour les deux versants (147,292).

La première hypothèse pour ces résultats est que la synthèse entraîne la production de produits dont l'un des sites de reconnaissance est altéré. Ceci est possible si la réduction du Fab' provoque la réduction des ponts intra-chaînes au niveau des parties hypervariables. Dans ce cas, l'association avec le PDM ou le deuxième Fab'-PDM se fera à ce niveau, altérant le site de reconnaissance de l'AcBs. Cette hypothèse ne peut pas être exclue car les

## Discussion

techniques de contrôle ne permettent pas de discriminer ces produits synthétisés en même temps que l'AcBs et ayant une taille et une structure similaire (en condition réduite pour le contrôle par électrophorèse). La seconde hypothèse, déjà évoquée dans la partie « résultat », est que les Acm utilisés pour la synthèse aient subi une altération durant leur conservation. Cette hypothèse ne peut pas être exclue car comme présenté au début du chapitre « matériels et méthode », seul l'intégrité structurale des Acm a été réalisée par une électrophorèse. Pour conclure sur l'optimisation de la synthèse des AcBs murins par des variations de pH, il sera nécessaire de contrôler l'intégrité de reconnaissance des Acm F6 et 679 par des études d'affinités.

D'autre part, les études d'immunoréactivités pour le versant 679 ont confirmé que la technique n'était pas réalisable avec des haptènes non conjugués avec une molécule porteuse comme l'albumine.

En effet, l'hypothèse suggérant que le versant 679 ne reconnaît pas le motif HSG de l'IMP-325 est peu réaliste. Comme le montrent les travaux présentés en 2006 par l'équipe de Goldenberg, l'IMP-325 radiomarqué à l'<sup>131</sup>I est bien reconnu par l'AcBs (167).

L'hypothèse la plus probable est donc que la fixation de l'haptène à la surface du tube a bloqué la présentation de l'Ag et de ce fait, aucune fixation de l'AcBs n'a été possible. En effet, l'IMP-325 est une petite molécule dont la structure rend vraisemblable une adsorption des séquences HSG aux parois.

Enfin, l'affinité mesurée pour le versant 679 avec l'haptène monovalent est relativement bonne avec un  $K_a = 7,14 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ . Elle reste cependant plus faible que celle réalisée avec l'haptène de référence AG4.0 pour lequel la constante d'affinité est de  $K_a = 6,8 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$  (147). Il est toutefois important de modérer ces résultats. En effet, les valeurs de  $K_a$  présentées ne sont que des estimations et elles ont été déterminées de façon expérimentale. Il serait donc intéressant de comparer la valeur de  $K_a$  de l'AG4.0 déjà obtenue avec celle mesurée par une titration par calorimétrie isotherme, indisponible lors des études réalisées avec l'AG4.0. D'autre part, l'haptène di-HSGL, indisponible au moment de notre étude, n'a pas pu être évalué par cette méthode. Il sera donc nécessaire de déterminer son  $K_a$  et de le comparer au résultat obtenu durant l'étude. Lors des premiers

## **Discussion**

travaux réalisés par Morandea et al en 2005 (293), les études de compétition montraient que l'haptène di-HSGL possédait une affinité similaire à l'haptène AG8.1 utilisé comme référence (294). Dans le brevet de l'AG8.1 déposé en 1994 par Gruaz-Guyon et al, les inventeurs signalent que la constante de dissociation de cet haptène avec l'Acm 679 est inférieure à  $10^{-6}$  M (295). La diminution de l'affinité pour l'haptène di-valent est justifié par l'encombrement stérique produit lors de la fixation de deux AcBs différents sur un même peptide (294). Il est donc probable que lors des mesures d'affinité entre l'AcBs et l'haptène di-HSGL, une diminution du  $K_a$  soit également mise en évidence. Cependant, au vu de la valeur mesurée lors de notre étude, une valeur de  $K_a$  supérieure à  $10^6$  M<sup>-1</sup> est attendue.

# CHAPITRE 2 : ÉTUDES RADIOCHIMIQUES

## DES COMPLEXES DU $^{68}\text{Ga}$

---

### I Matériels et méthodes

#### I.A Matières premières

L'ensemble des réactifs utilisés est commercialisé par la société Sigma-Aldrich (USA). Les solutions tampons sont réalisées par le mélange des acides et des bases conjuguées en proportions variables dans de l'eau UP (eau ultra-pure, résistivité de 18,2M $\Omega$ .cm). Les solutions commerciales sont toutes de qualité ultratrace pour limiter la contamination par des métaux.

Le générateur est produit par le cyclotron d'Obninsk (Russie) et commercialisé par la société IASON (Autriche). Ce générateur possède une activité de 370 MBq à la date de calibration.

Le DOTA non fonctionnalisé est commercialisé par la société Aldrich (Sigma-Aldrich, USA).

L'HBED a été synthétisé par le Dr Amaury du Moulinet d'Hardemare (département de chimie moléculaire, UMR CNRS 5250, Université de Grenoble).

Les souris utilisées pour l'ensemble des études *in vitro* et *in vivo* sont des souris blanches femelles de souche CD-1 (Charles River, Lyon). Les protocoles ont tous été validés par le Comité d'Éthique en Expérimentation Animale de Grenoble (CEEA N°12). La demande d'autorisation de projet a été enregistrée sous le numéro 223\_LER-U1039-CG-02.

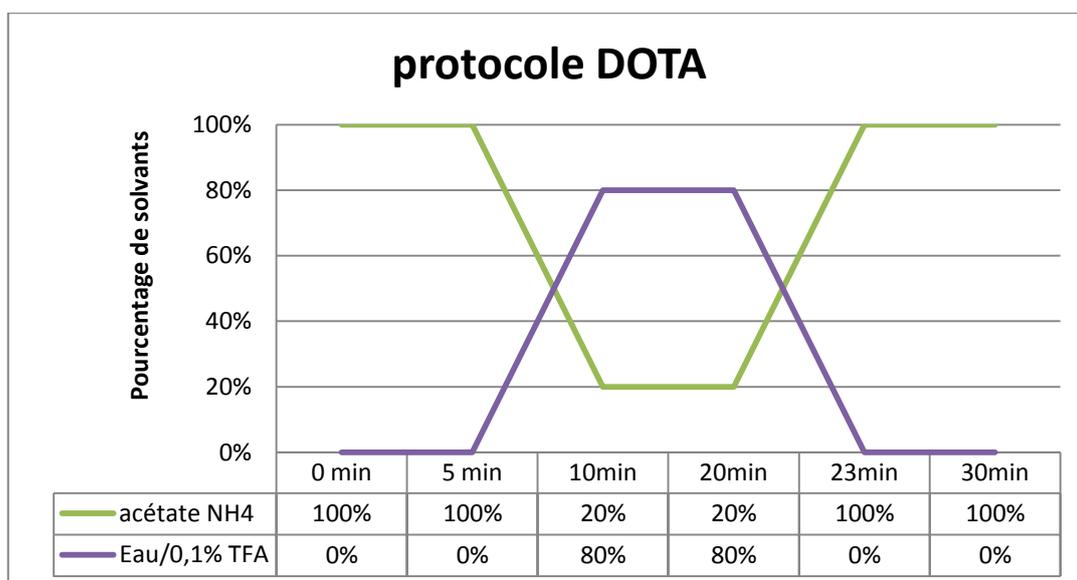
#### I.B Matériels

##### I.B.1 Chromatographie liquide

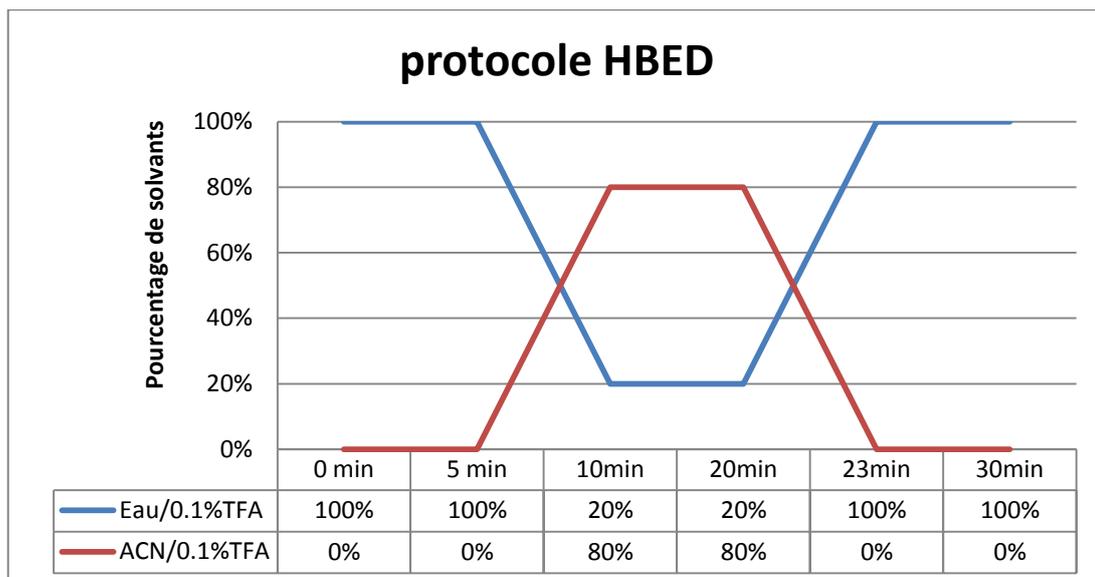
L'analyse par chromatographie liquide est une technique de référence pour les études de radiochimie. Dans les conditions utilisées, les concentrations des produits à analyser étaient trop faibles pour que ceux-ci soient détectés par spectrométrie UV - visible. La détection a donc été réalisée par le suivi de la radioactivité grâce un radiodétecteur. Pour nos analyses, nous avons utilisé une chaîne CLHP analytique (pompe, détecteur UV, Shimatzu Europe,

**Matériels et méthodes – Matériels**

Allemagne) couplée à un radiodétecteur Flow Ram<sup>®</sup> (LabLogic, USA) et pilotée par le logiciel Laura<sup>®</sup> (version 4 sp1, LabLogic, USA). La séparation des composés en fonction de leur polarité est réalisée grâce à une colonne Luna<sup>®</sup> C18 (25 cm\*4.6 mm\*5  $\mu\text{m}$ \*100 Å, Phenomenex, France). Cette colonne est composée d'une matrice de silice où sont greffées des chaînes à 18 carbones. Le solvant d'éluion est un système à 2 solvants. Pour les études avec le DOTA, il se compose d'un tampon acétate de Na 50nM à pH 5 et d'eau UP contenant 0,1% de TFA (acide trifluoroacétique). Pour les analyses avec l'HBED, il s'agit d'un mélange d'eau UP contenant 0,1% de TFA et d'ACN (acétonitrile) contenant 0,1% de TFA. Les protocoles de gradients avec les pourcentages de chaque solvant au cours de l'analyse sont présentés dans les figures 39 et 40.



**Figure 39. Protocole CLHP pour les analyses du complexe DOTA- $^{68}\text{Ga}$**

**Matériels et méthodes – Matériels****Figure 40. Protocole CLHP pour les analyses du complexe HBED- $^{68}\text{Ga}$** **I.B.2 Mesure de la radioactivité**

Différents appareils ont été utilisés pour la mesure de la radioactivité. Durant les synthèses, les solutions ont été mesurées à l'aide d'un activimètre Medi 303 (Medisystem, France) présent dans l'enceinte. Pour les études de stabilité *in vitro* et la détermination des coefficients de partage, l'activimètre utilisé était un Medi 202 (Medisystem, France). La radioactivité des échantillons solides et liquides issus des biodistributions *in vivo* a été mesurée par un compteur  $\gamma$  de radioactivité Wizard 2 (Perkin-Elmer, USA). Chaque tube a été compté 1 min dans une fenêtre de comptage allant de 20 keV à 1800 keV.

**I.B.3 Radioprotection**

La manipulation de la radioactivité nécessite une protection pour limiter l'irradiation du manipulateur. Le  $^{68}\text{Ga}$  est un émetteur de positon possédant un rayonnement  $\gamma$  de haute énergie. D'après le « guide pratique Radionucléides et Radioprotection », il est donc classé dans le groupe de risque 2 soit élevé (296). L'ensemble des manipulations de radiomarquage ont été réalisées dans une enceinte Lempax (France) de haute énergie (blindage de 35 mm de Pb, couche de demi-atténuation du Pb = 6 mm). Le facteur d'atténuation des rayonnements  $\gamma$  pour une épaisseur de Pb de 35 mm est de 100. Pour limiter la contamination atmosphérique, l'enceinte est en dépression par rapport à la pression atmosphérique. Un système d'éluion semi-automatique a été monté dans l'enceinte,

## Matériels et méthodes – Matériels

limitant ainsi l'irradiation aux doigts. Le circuit est composé de tubulures et de robinets 3 voies fournis par le CHU de Grenoble. Les fournisseurs de ce type de matériel ont varié au cours des expérimentations selon les marchés publics. Les tubulures sont en plastique polychlorure de vinyle d'une longueur de 50 cm terminées par un embout mâle d'un côté et femelle de l'autre. Les robinets 3 voies en plastique polychlorure de vinyle possèdent deux embouts femelle et un embout mâle. Des connecteurs mâle ou femelle en plastique polychlorure de vinyle ont été utilisés pour le montage. Un pousse seringue sur lequel est adapté une seringue de 10 mL contenant le solvant d'éluion est utilisée pour normaliser le débit. Les flacons pour collecter l'éluat sont en verre boro-silicaté de type 1 (Wheaton, Royaume-Unis) d'une contenance de 10 mL, bouchés par des bouchons en plastiques et sertis pour empêcher l'éjection du bouchon sous l'effet de pression liée aux chauffages. Les flacons sont stockés dans des pots en Pb de 25 mm d'épaisseur. La colonne échangeuse de cations est protégée par une brique de Pb de 50 mm. Enfin pour limiter la contamination par des métaux, les aiguilles Stérican® (BBraun, France) en acier chrome – nickel inoxydable ont été choisies.

## I.C Méthodes

### I.C.1 Étude de poste

L'étude de poste a été réalisée en prenant comme référence le guide pratique "Radionucléides et Radioprotection" (296). Les débits de dose ont été calculés pour une source ponctuelle de 200 MBq. Le prélèvement des échantillons a été réalisé par retournement du flacon. Les paramètres de temps par étapes, de distance, de la présence d'un blindage et de nombre de répétition de la manipulation ont été estimés.

Le débit de dose pour chaque étape a été calculé par l'équation :

$$\Gamma \times \frac{A}{D^2} \times \left( \frac{1}{2} \left( \frac{n}{CDA} \right) \right) \times \left[ \frac{\mu_{en}}{\rho} \right]_{\text{air}} m$$

Où  $\Gamma$  : est la constante de Kerma dans l'air en  $\text{mSv.h}^{-1}.\text{m}^2.\text{MBq}^{-1}$ .

Plusieurs valeurs sont déterminées :  $1,8.10^{-4} \text{ mSv.h}^{-1}$  pour 1 m et 1 MBq.

$5,5.10^{-1} \text{ mSv.h}^{-1}$  au contact avec prise sur le dessus

## Matériels et méthodes – Méthodes – Études de poste

A : l'activité en MBq

D : la distance en m. Dans le cas d'un contact, ce terme est supprimé et remplacé par l'activité.

n : l'épaisseur du blindage de Pb en mm

CDA : couche de demi-atténuation du Pb pour un radionucléide donné

$\left[ \frac{\mu_{en}}{\rho} \right]_{air}^m$  : rapport des coefficients massiques d'absorption en énergie entre l'air et le milieu. En médecine nucléaire pour des solutions aqueuses, ce rapport est de 1,111

### I.C.2 Description générale du protocole de synthèse des complexes

Le circuit utilisé pour le radiomarquage est présenté figure 41. Pour limiter l'irradiation, le radiomarquage est réalisé directement après la production du  $^{68}\text{Ga}$  et la pré-purification de l'éluat. Pour des raisons de compréhension, la méthode est scindée en 3 étapes : élution du générateur, pré-purification de l'éluat, radiomarquage. Elles sont détaillées dans la suite de ce chapitre.

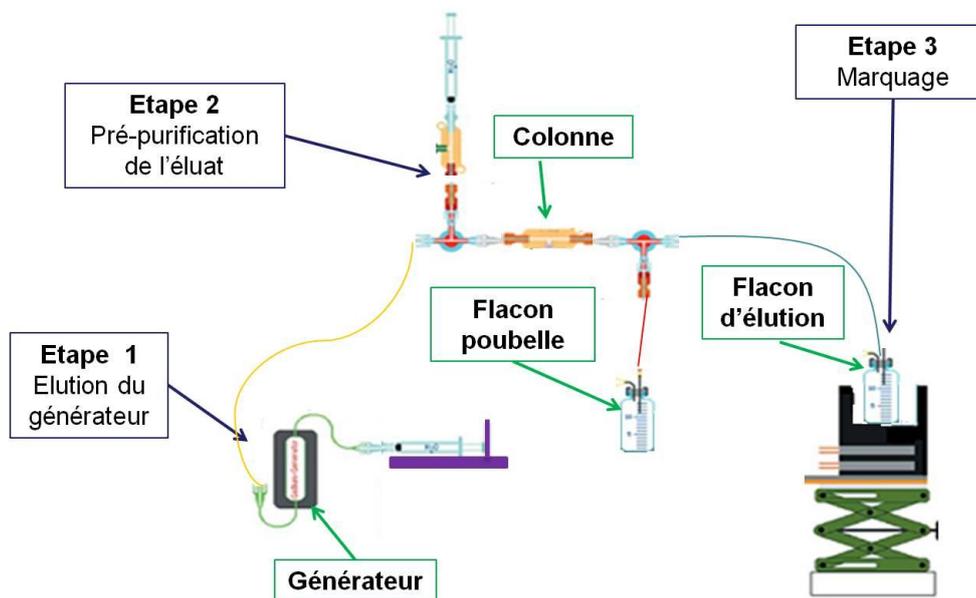


Figure 41. Schéma général du circuit d'élution du générateur  $^{68}\text{Ge} / ^{68}\text{Ga}$

## **Matériels et méthodes – Description générale du protocole de synthèse des complexes**

### **I.C.2.a Éluion du générateur**

Le générateur est élué par 5 mL d'HCl 0,1 M selon les recommandations du fournisseur. L'éluion est réalisée à l'aide d'une pompe dont les paramètres de débit sont fixés à 2 mL / min pour un volume de 5 mL et un diamètre de seringue de 14 mm. Le solvant passe dans la colonne  $\text{TiO}_2$  et décroche le  $^{68}\text{Ga}$  formé par décroissance du  $^{68}\text{Ge}$  au cours du temps. Afin d'éliminer le  $^{68}\text{Zn}$  formé par la décroissance du  $^{68}\text{Ga}$ , la première éluion journalière est une pré-éluion. La deuxième éluion est réalisée à 4 h d'intervalle afin que 90 % de l'activité maximale puisse être à nouveau éluee.

### **I.C.2.b Pré-purification de l'éluat**

La purification de l'éluat de  $^{68}\text{Ga}$  est indispensable pour limiter la présence de métaux contaminants et permettre d'obtenir une activité spécifique (AS) suffisante lors des radiomarquages. Les méthodes par fractionnement, échange cationique et échange anionique présentées dans la partie 1 de ce manuscrit ont toutes été évaluées.

#### **Purification par fractionnement de l'éluat**

La méthode par fractionnement est la plus simple à mettre en œuvre car il s'agit d'une méthode mécanique qui ne nécessite pas d'étape supplémentaire entre l'éluion et le radiomarquage. L'éluion du générateur est réalisée avec 5 mL d'HCl 0,1 M répartis en 3 fractions : la fraction 1 de 1 mL d'HCl 0,1 M qui est éliminée, la fraction 2 de 2,5 mL qui est conservée et enfin la fraction 3 de 1,5 mL qui est également éliminée. Techniquement, les fractions 1 et 3 sont éluées directement dans le flacon poubelle. La fraction 2 est récupérée dans le flacon d'éluion. L'activité de chaque flacon est mesurée et le rendement d'éluion est calculé. Il correspond au pourcentage de l'activité de l'éluat purifié par rapport à l'activité totale éluee du générateur.

#### **Purification par échange anionique**

La purification de l'éluat par échange anionique reprend la technique présentée par De Blois et al. Elle est adaptée à notre montage (fig. 42). La colonne utilisée est une colonne Oasis WAX (Agilent Technologie, USA) pré-conditionnée avec 2 mL d'HCl 5 M. Après l'éluion du générateur, l'éluat est acidifié avec 5 mL d'HCl 8 M puis transféré dans la colonne par l'injection d'air dans le flacon d'acidification. L'éluion de la colonne est réalisée avec 500  $\mu\text{L}$

### Matériels et méthodes – Description générale du protocole de synthèse des complexes

d'eau UP. Les activités des flacons et de la colonne sont mesurées pour calculer le rendement d'éluion.

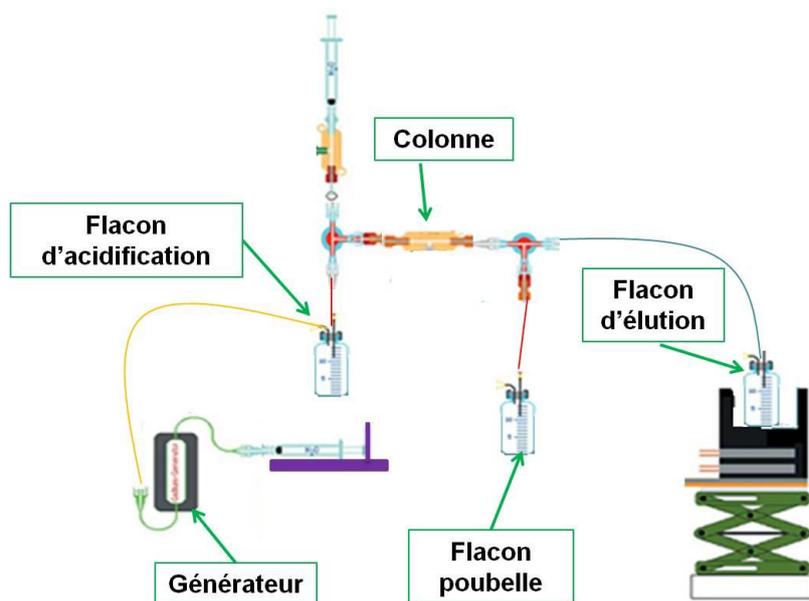


Figure 42. Schéma du circuit d'éluion du générateur pour la pré-purification par échange anionique

### Purification par échange cationique

Deux techniques de purification par échange cationique ont également été testées.

La première utilise la méthode présentée par Ocak et al. Une colonne Oasis MCX non préconditionnée (Agilent Technologie, USA, fonctions d'échanges sulfonates, volume de 1 mL) retient les ions  $^{68}\text{Ga}^{3+}$  après l'éluion du générateur. La colonne MCX est un équivalent de la Strata-X-C (Phenomenex, USA) utilisée par les auteurs. Le  $^{68}\text{Ga}$  est ensuite élué par 800  $\mu\text{L}$  d'un mélange d'acétone / HCl 0,002M (dans un ratio 98 / 2) suivi de 3 mL d'eau UP. A la fin de l'étape de purification, la colonne et les flacons poubelle et d'éluion sont mesurés à l'activimètre pour quantifier les activités présentes dans chacun d'eux et calculer le rendement d'éluion. Une évaporation de l'acétone est ensuite nécessaire avant l'étape de radiomarquage. Celle-ci est réalisée par le chauffage de l'éluat purifié à 90 °C dans un bloc chauffant. La vapeur formée est éliminée à travers le bouchon par une prise d'air.

La seconde technique, décrite par Mueller et al., utilise une colonne Oasis SCX (Agilent Technologie, USA). La colonne est pré-conditionnée par 1 mL d'HCl 5 M et rincée par 5 mL d'eau UP. Le  $^{68}\text{Ga}$  est élué dans le flacon d'éluion par 550  $\mu\text{L}$  d'une solution de NaCl 5M

### **Matériels et méthodes – Description générale du protocole de synthèse des complexes**

contenant 12,5  $\mu\text{L}$  HCl 5 M (soit 2,27 % HCl 5 M). Comme précédemment, le rendement d'élution est calculé.

#### **I.C.2.c Radiomarquage**

L'étape de radiomarquage a lieu directement dans le flacon d'élution. La solution contenant le chélatant est préparée extemporanément dans le flacon serti avant la manipulation. Afin de permettre la réaction de marquage, le mélange réactionnel doit être à un pH compris entre 3,5 et 4,2. Comme évoqué dans le chapitre 1, au-delà d'un pH 5, le  $\text{Ga}^{3+}$  sous la forme d'hydroxo-complexes, n'est pas complexé par le chélatant. Le  $^{68}\text{Ga}$  étant élué par de l'HCl 0,1 M, une solution tampon concentrée est nécessaire pour maintenir le pH de la réaction dans cet intervalle.

D'une façon générale, la solution de chélatant est diluée dans un tampon concentré à 1 M. L'éluat purifié est recueilli dans le flacon d'élution contenant déjà la solution de chélatant. Le mélange est alors mis à incuber. En fin de radiomarquage, un contrôle est réalisé par CLHP. L'analyse CLHP permet de réaliser le calcul de la pureté radiochimique du complexe. Il correspond au pourcentage de la radioactivité du complexe par rapport à la radioactivité totale dans l'échantillon. Le pourcentage de la radioactivité du complexe est quantifié par l'intégration de son pic d'activité grâce au logiciel Laura<sup>®</sup>. Dans nos études, la pureté radiochimique peut être assimilée au rendement de radiomarquage. En effet, le radiomarquage est réalisé en une seule étape et de ce fait, aucunes pertes liées à des étapes précédant ou suivant la complexation ne doivent être prises en compte. La complexation est considérée comme acceptable pour un rendement de radiomarquage de 95% au minimum. En deçà, le rendement est insuffisant et une purification du produit doit être réalisée.

#### **I.C.3 Calcul de l'osmolarité de la solution de complexes radiomarqués**

Le tampon de radiomarquage est préparé à la concentration de 1 M. De ce fait, la concentration finale de la solution de produit radiomarqué à 0,370 M est trop élevée pour une injection *in vivo*. En clinique, la solution est diluée de façon importante dans du sérum physiologique pour permettre son injection par voie intra-veineuse. Dans notre étude, aucune étape de dilution de la solution n'est prévue avant l'injection chez l'animal. Pour vérifier la conformité de l'osmolarité de la solution pour une injection intra-veineuse en

### **Matériels et méthodes – Méthodes – Calcul de l'osmolarité de la solution de complexe**

bolus (< 700 mOsm / L), un calcul de l'osmolarité de la solution de produits radiomarqués est réalisé. L'osmolarité se définit comme le nombre de moles de particules en solution dans 1 L de solution. Elle dépend de la concentration en soluté et du nombre de particules formées par la dissolution d'une molécule de soluté (noté i). Un facteur de correction est appliqué si toutes les molécules de soluté ne se dissocient pas en solution (appelé également coefficient osmotique et noté  $\phi$ ).

L'équation de l'osmolarité s'écrit :

$$\text{Osmolarité} = \left(\frac{n}{V}\right) * (i) * (\phi)$$

n = nombre de moles de soluté

V = volume de la solution

i = nombre de particules formées par la dissolution du soluté

$\Phi$  = coefficient osmotique

Dans notre étude, le NaCl et l'acétate de sodium se séparent en deux particules donc i = 2.

Pour simplifier les calculs, toutes les molécules de solutés sont totalement dissoutes

donc  $\phi = 1$

Le tampon HEPES ne se sépare pas donc i = 1. De ce fait, aucune correction ne doit être apportée donc  $\phi = 1$ .

#### **I.C.4 Étude de la contamination par les métaux dans l'éluat de <sup>68</sup>Ga**

Pour évaluer l'efficacité de la purification de l'éluat de <sup>68</sup>Ga par les différentes techniques présentées dans la littérature et choisir la technique donnant la meilleure purification, un dosage des métaux dans l'éluat purifié a été réalisé. Afin d'augmenter le nombre d'échantillons et élargir à plusieurs générateurs, une collaboration avec les CHU de Bordeaux et Nantes a été mise en place. Les échantillons ont été analysés soit par le laboratoire d'analyse du cyclotron ARRONAX pour les éluats de Nantes et de Bordeaux, soit par le laboratoire de toxicologie du CHU de Grenoble pour les échantillons issus de notre générateur.

Les 3 techniques de purification (fractionnement, échange cationique et anionique) ont été évaluées. Les générateurs des sites de Nantes et de Bordeaux sont des générateurs

**Matériels et méthodes – Méthodes – Études de la contamination par les métaux dans l'éluat de  $^{68}\text{Ga}$**

d'Obninsk et possèdent une activité de 1,85 GBq. Les éluats produits sont donc considérés comme identiques. Le générateur de Grenoble est également fabriqué par le cyclotron d'Obninsk et bien que celui-ci ne possède qu'une activité de 370 MBq, les éluats issus de ce générateur sont également considérés comme identiques à ceux de Nantes et Bordeaux.

Au CHU de Bordeaux, les éluats ont tous été purifiés par une méthode anionique après un fractionnement de l'éluat. Succinctement, le générateur est élué avec 6,2 mL d'acide chlorhydrique 0.1 M. L'élution est fractionnée par volumes de 1 mL, ce qui permet d'obtenir 60% de la radioactivité dans 3 mL. Puis la solution est acidifiée avec 5 mL d'acide chlorhydrique 12 M ultrapur pour obtenir une concentration finale d'HCl à 4 M. Cette solution est ensuite transférée sur une cartouche échangeuse d'anions SPE cartridge Chromafix (ThermoFischer Scientific, USA). L'excès d'HCl est éliminé en lavant la cartouche avec 0,5 mL de NaCl 5 M. L'élution est réalisée par 200  $\mu\text{L}$  d'eau UP dans des flacons d'élution de 10 mL en verre boro-silicate de type 1 (CisBio, France).

Au CHU de Nantes, les éluats ont été purifiés soit par fractionnement soit par échange cationique en utilisant la technique d'Ocak ou de Mueller. Deux types de verres ont été utilisés pour recevoir les éluat : des verres boro-silicate de type 1 (CisBio, France) ou des flacons fournis par Eckert et Ziegler (Allemagne), commercialisant le générateur de  $^{68}\text{Ge}$  /  $^{68}\text{Ga}$ . Ces derniers ont été lavés à l'HCl 5 M afin de limiter la contamination par les métaux adsorbés sur le verre.

Pour la technique par fractionnement, l'élution du générateur est réalisée par un volume de 6 mL d'HCl 0,1 M. La fraction centrale d'un volume de 3 mL est récoltée dans le flacon d'élution (CisBio, France).

Pour les techniques de purification par échange cationique, l'élution du générateur est réalisée par un volume de 6 mL d'HCl 0,1 M. Les flacons d'élution utilisés sont des flacons lavés à l'HCl. Les méthodes de purification sont toutes deux basées sur l'échange cationique. Pour la technique d'Ocak, la colonne est une Strata-X-C non pré-conditionnée. L'élution est réalisée en deux temps. Une imprégnation de la colonne par 300  $\mu\text{L}$  d'acétone / HCl 0,002M (98 : 2) durant 30s est suivie d'une élution par 500  $\mu\text{L}$  d'eau UP. Pour la technique de Mueller, la colonne utilisée est une SCX pré-conditionnée par 1 mL d'HCl 5,5 M suivie par 5

**Matériels et méthodes – Méthodes – Études des cinétiques de radiomarquage des chélatants avec le  $^{68}\text{Ga}$**

mL d'eau UP. L'éluion est réalisée par un volume de 500  $\mu\text{L}$  d'un mélange de NaCl 5 M / HCl 5,5 M à 2,73 %.

Pour les échantillons de Bordeaux et de Nantes, l'analyse des échantillons a été réalisée par un spectromètre ICP-OES iCAP 600 (ThermoFischer, USA). Après une évaporation des solvants à 60°, les échantillons sont repris dans 800  $\mu\text{L}$  d'acide nitrique 1 % ultrapur. Les métaux dosés sont l'Al, le Zn, le Fe. Les résultats sont exprimés en ppb ( $\mu\text{g} / \text{L}$ ).

Sur notre site, les trois techniques de purification décrites précédemment dans ce chapitre (pré-purification de l'éluat) ont été testées. Succinctement, la méthode par fractionnement permet d'obtenir un éluat purifié de 2,5 mL en HCl 0,1 M. L'éluat purifié par la colonne échangeuse d'anions est en eau UP pour un volume de 500  $\mu\text{L}$ . Enfin pour la purification par échange de cations, la technique choisie est celle utilisée pour l'ensemble des essais de radiomarquage. Il s'agit d'une technique dérivée de la méthode de Mueller. La colonne est pré-conditionnée par 1 mL d'HCl 5 M et rincée par 5 mL d'eau UP. Le  $^{68}\text{Ga}$  est élué dans le flacon d'éluion par 400  $\mu\text{L}$  d'une solution de NaCl 2 M contenant 2,75% d' HCl 5 M puis conservé pour analyse. L'ensemble des éluats purifiés sont recueillis dans des flacons de 5 mL (Wheaton, Royaume-Unis). Les dosages sont réalisés au sein du pôle de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie du CHU de Grenoble. Le principe du dosage repose sur le dosage des métaux par ajout dosé à partir d'une solution témoin. L'appareil utilisé est un ICP-MS ThermoElectron Xseries II (ThermoFischer scientific, USA). Les métaux dosés sont Al, Fe, Zn.

### **I.C.5 Études des cinétiques de radiomarquage des chélatants avec le $^{68}\text{Ga}$**

Plusieurs conditions de radiomarquage ont été évaluées pour chacun des chélatants. Une étude cinétique a été réalisée afin de déterminer les temps d'incubation optimaux et ainsi de comparer les conditions entre-elles. Lors de l'étape de radiomarquage, des prélèvements successifs à 10 min, 20 min et 30 min permettent de mesurer l'évolution du marquage au cours du temps. La radioactivité prélevée est contrôlée par une mesure dans le flacon d'éluion avant et après prélèvement. Puis, un contrôle du pH de la solution et une analyse CLHP sont réalisés. Le pH est mesuré par une bandelette papier pH allant de 3,5 à 5 par

## **Matériels et méthodes – Méthodes – Protocoles de radiomarquages des chélatants**

intervalles de 0,2 (Duotest<sup>®</sup>, Macherey-Nagel, Allemagne). Les protocoles CLHP étant de 30 min, les échantillons à analyser sont placés à 4°C pour ralentir la réaction de radiomarquage. Pour chaque analyse, le rendement de radiomarquage est évalué par l'intégration des différents pics d'activité grâce au logiciel Laura<sup>®</sup>.

Pour confirmer le choix des conditions de complexation, une répétition des radiomarquages est réalisée (n = 3). Ces conditions sont ensuite fixées pour l'ensemble des études radiochimiques des complexes DOTA- $^{68}\text{Ga}$  et HBED- $^{68}\text{Ga}$ .

### **I.C.6 Protocoles de radiomarquage des chélatants**

#### **I.C.6.a Radiomarquage du DOTA par le $^{68}\text{Ga}$**

Une quantité de 115 nmol de DOTA (solution de 2,3 nM en NaCl 0,9%) diluée par 240  $\mu\text{L}$  de tampon acétate 1 M pH 5,6 est incubée à 95 °C durant 10 min avec 400  $\mu\text{L}$  d'une solution d'éluat de  $^{68}\text{Ga}$  en NaCl 2 M /2,75 % d'HCl 5 M (soit environ 150 à 170 MBq). La formation du complexe est contrôlée par CLHP et le rendement de radiomarquage est calculé. Pour un rendement inférieur à 95 %, la solution de complexes radiomarqués n'est pas utilisée pour les études.

#### **I.C.6.b Radiomarquage de l'HBED-par le $^{68}\text{Ga}$**

Une quantité de 23 nmol d'HBED (solution de 2,3 nM en tampon bicarbonate 50 mM pH 9) diluée par 240  $\mu\text{L}$  de tampon acétate 1 M pH 5,6 est incubée à 95°C durant 10 min avec 400  $\mu\text{L}$  d'une solution d'éluat de  $^{68}\text{Ga}$  en NaCl 2 M /2,75 % d'HCl 5 M (soit environ 150 à 170 MBq). La formation du complexe est contrôlée par CLHP et le rendement de radiomarquage est calculé. Pour un rendement inférieur à 95 %, la solution de complexes radiomarqués n'est pas utilisée pour les études.

### **I.C.7 Études des complexes dans la solution injectable**

#### **I.C.7.a Études de stabilités des complexes dans la solution injectable**

Pour réaliser l'injection aux souris, la solution doit être préalablement diluée et son pH doit être augmenté à 7. Pour cela, après radiomarquage, les solutions sont refroidies rapidement par la mise en contact du flacon d'éluat avec de la glace. La solution est ensuite placée à TA. Un volume de 700  $\mu\text{L}$  d'une solution de NaCl 0,9 % à 2,3 % de NaOH 5 M

### **Matériels et méthodes – Méthodes – Études des complexes dans la solution injectable**

est ajouté à 150  $\mu\text{L}$  de la solution de produit afin d'être dans les conditions d'injection de la solution de complexes (700 mOsmol, pH 6,8 – 7). Puis des prélèvements de 50  $\mu\text{L}$  sont réalisés à 0 min, 120 min et 180 min. Chaque échantillon est analysé par CLHP et un calcul de la pureté radiochimique est effectué. La pureté radiochimique représente le pourcentage de radioactivité du complexe radiomarké au  $^{68}\text{Ga}$  par rapport aux pourcentages de radioactivité des autres espèces radiomarkées présentes dans la solution. La pureté radiochimique est calculée par le rapport des aires sous courbes grâce à l'intégration des pics de radioactivité du complexe, des produits de dégradation radiomarkés et du  $^{68}\text{Ga}$  libre grâce au logiciel Laura<sup>®</sup>.

#### **I.C.7.b Mesure du coefficient de partage des complexes radiomarkés**

Comme évoqué au chapitre 1, le chélatant peut modifier de façon notable le caractère hydrophile ou lipophile d'un vecteur peptidique ou d'un haptène. La lipophilie de chaque complexe est mesurée par son coefficient de partage entre l'octanol et le tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4. Plus le coefficient a une valeur négative, plus le produit sera hydrophile.

Le coefficient, noté  $\log(P)$ , est mesuré dans notre étude par le logarithme décimal du rapport entre les activités présentes dans l'octanol et le tampon phosphate. Après radiomarkage, 150  $\mu\text{L}$  de la solution est diluée par 700  $\mu\text{L}$  d'une solution de NaCl 0,9 % / 2,3 % de NaOH 5M. Après contrôle du produit par CLHP, 50  $\mu\text{L}$  de la solution est mélangé à 1000  $\mu\text{L}$  d'une solution octanol-phosphate (1 : 1). Le mélange est homogénéisé durant 1 min puis centrifugé durant 10 min à 12600 g. La phase octanol est prélevée et les activités de deux phases sont mesurées séparément. Aucune correction de décroissance de la radioactivité n'est réalisée.

#### **I.C.8 Études *in vitro* des complexes du $^{68}\text{Ga}$ dans le sang de souris**

Si la caractérisation des complexes du  $^{68}\text{Ga}$  et des ligands d'intérêt par la constante de stabilité et par leur inertie cinétique est satisfaisante du point de vue chimique, ces données ne reflètent pas correctement le comportement du complexe dans un milieu comme le sang. Des études de liaisons aux cellules sanguines et aux protéines plasmatiques ainsi que des études de stabilité du complexe dans le sang de souris sont donc indispensables. Elles évaluent la proportion de complexe fixée aux cellules sanguines et aux protéines

**Matériels et méthodes – Méthodes – Études *in vitro* des complexes dans le sang de souris**

plasmatiques, la décomplexation du  $^{68}\text{Ga}$  ainsi que la dégradation enzymatique du complexe au cours du temps.

**I.C.8.a Prélèvement du sang de souris**

Les études physico-chimiques ont été menées en parallèle les unes des autres afin de répondre à la législation concernant l'expérimentation animale et réduire le nombre d'animaux nécessaire aux expériences.

Le sang de souris est prélevé par ponction intra-cardiaque sur une souris CD-1 anesthésiée. L'anesthésie est réalisée par l'injection intra-péritonéale de 10 mL / kg d'un mélange contenant 33 % (v / v) de xylazine (Rompun 2 g / 100 mL, Bayer, Allemagne) et 67 % (v / v) de kétamine (Imalgène 1000, 100 mg / mL, Merial, France). Le prélèvement est effectué par une seringue tuberculine (Terumo®, Japon) préalablement enduite avec de l'héparine sodique (5000 UI / mL, Choay, France) pour empêcher la coagulation du sang. Le sang est ensuite conservé à 4 °C dans un tube de 1,5 mL dont les parois sont également enduites avec de l'héparine sodique et utilisé au maximum 5 h après son prélèvement.

**I.C.8.b Étude de la liaison des complexes du  $^{68}\text{Ga}$  aux cellules sanguines**

Après radiomarquage, 150  $\mu\text{L}$  de la solution refroidie de complexes radiomarqués est diluée par 700  $\mu\text{L}$  d'une solution de NaCl 0,9 % / 2,3 % de NaOH 5 M. Un volume de 300  $\mu\text{L}$  de cette solution est ajouté à 1 mL de sang de souris héparinée (soit une activité de 16 MBq environ pour une activité de départ de 200 MBq). Ce volume correspond à une quantité de 1,8 nmol de complexe radiomarqué pour l'HBED et de 6,2 nmol de complexe radiomarqué pour le DOTA. L'activité volumique finale du mélange est de 12,5 MBq / mL. Le mélange est incubé à 37°C au bain marie. Pour étudier la répartition sanguine du complexe au cours du temps, un volume de 100  $\mu\text{L}$  du mélange est prélevé à 0 min, 30 min, 60 min, 120 min et 180 min. Celui-ci est centrifugé à 7400 g durant 3 min. Le surnageant est séparé du culot. Les activités du surnageant et du culot sont mesurées séparément. Le pourcentage de liaison aux cellules sanguines est calculé par le rapport entre l'activité mesurée dans le culot et l'activité mesurée dans le surnageant. Aucune correction de décroissance de la radioactivité n'a été réalisée pour cette étude, les mesures étant réalisées successivement.

### **I.C.8.c Étude de la liaison des complexes du $^{68}\text{Ga}$ aux protéines**

L'étude de la liaison des complexes aux protéines plasmatiques est réalisée dans la continuité de l'étape précédente. Deux techniques ont été testées. La première est une précipitation des protéines par du TCA (acide trichloroacétique). La deuxième est une rétention des protéines par filtration.

Comme précédemment, des échantillons sont prélevés à 0 min, 30 min, 60 min, 120 min et 180 min. Après séparation avec les cellules sanguines, un volume de 10  $\mu\text{L}$  de TCA 50 % est ajouté au plasma. La précipitation est instantanée. Le mélange est homogénéisé puis centrifugé durant 3 min à 12600 g. Le surnageant est prélevé et l'activité des deux échantillons est mesurée séparément. Le pourcentage de liaison aux protéines est calculé par le rapport entre l'activité du culot et l'activité du surnageant. Aucune correction de la radioactivité n'a été réalisée pour cette étude.

La deuxième technique est une technique de filtration. Le plasma, récupéré selon les mêmes étapes que précédemment, est placé dans un filtre Nanosep 10 K omega. La filtration est réalisée par une centrifugation de 10 min à 12600 g. Les protéines de tailles supérieures ou égales à 10 kDa sont retenues par le filtre. Le complexe et le  $^{68}\text{Ga}$  libre sont dans le filtrat. L'activité des deux échantillons est mesurée et le pourcentage de liaison aux protéines est calculé. Aucune correction de décroissance de la radioactivité n'est réalisée.

### **I.C.8.d Stabilité sanguine des complexes du $^{68}\text{Ga}$**

La stabilité des complexes est la dernière étape du protocole détaillé précédemment. Après élimination des cellules sanguines et des protéines, un volume de 20  $\mu\text{L}$  de surnageant est analysé par CLHP et la pureté radiochimique du complexe est calculée.

## **I.C.9 Études de biodistribution des complexes *in vivo* chez la souris**

Les études de biodistribution ont été réalisées chez la souris femelle de souche CD-1. Les animaux ont été séparés en deux groupes de 3 animaux, correspondant au deux temps d'analyse de 10 min et 60 min post-injection. Une activité de 1 MBq de la solution de complexes radiomarqués est injectée par voie IV dans l'une des 2 veines caudales de la

**Matériels et méthodes – Méthodes – Études de biodistribution *in vivo* des complexes chez la souris**

souris. Pour connaître l'activité réellement injectée, la radioactivité contenue dans la seringue est mesurée avant et immédiatement après l'injection.

Au temps 10 min ou 60 min post-injection, l'animal est anesthésié par injection intrapéritonéale de 10 mL / kg de poids d'une solution de xylazine / kétamine (un tiers pour deux tiers). Après vérification de son état d'inconscience, la souris est euthanasiée par exsanguination. Les organes prélevés sont : le sang, l'urine, la bile, les poumons, le foie, le pancréas, la rate, le cœur, l'intestin grêle vidé, l'estomac vidé, le muscle, l'os (contenant la moelle osseuse), le rein, les ovaires, la peau et le cerveau. La queue est également prélevée pour contrôler la quantité de produit retenue au point d'injection. La mesure de la radioactivité de la queue, corrigée de la décroissance, permet de calculer l'activité réelle de produit injecté.

Les tissus sont pesés et placés dans des tubes. Leur radioactivité est ensuite mesurée par un compteur gamma Wizard II. Le compteur gamma donne des valeurs de radioactivité en coups par minute (CPM). Une activité étalon de la solution est également mesurée pour convertir les CPM en MBq. Pour chaque organe, le pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu est calculé (%DI / g), après correction de la décroissance.

### **I.C.10 Analyses statistiques**

Les variables quantitatives ont été décrites à l'aide de la moyenne et de l'écart-type. Pour les groupes de taille faible ( $n \leq 7$ ) qui ne garantissent pas une distribution normale, des tests non-paramétriques ont été utilisés. Les comparaisons des moyennes en inter-groupes ont été effectuées à l'aide des tests de Mann-Whitney. Le seuil de significativité est fixé conventionnellement à 5 % ( $p < 0,05$ ). Pour les groupes de taille suffisante pour garantir une distribution normale, un t-test de Student de comparaison des moyennes en inter-groupes a été utilisé. Comme précédemment, le seuil de significativité est fixé conventionnellement à 5 % ( $p < 0,05$ ).

## II Résultats

### II.A Apport du circuit et caractérisation du générateur

Comme présenté dans la partie « méthode », le  $^{68}\text{Ga}$  est un émetteur de positons considéré comme un radionucléide à risque élevé. Il doit normalement être manipulé dans une enceinte de haute énergie et l'ensemble des étapes de marquage doivent être réalisées avec l'aide d'un automate. Aucun automate n'étant accessible durant ce travail, un circuit semi-automatique a été créé pour limiter la dosimétrie de l'opérateur (fig. 43). Les tubulures du circuit possèdent un volume résiduel important de 660  $\mu\text{L}$ . De plus, lors de l'élution du générateur, un volume résiduel d'HCl était systématiquement observé au niveau de la colonne de purification. Pour éliminer l'HCl et manipuler des volumes inférieurs à 600  $\mu\text{L}$ , un système d'injection d'air a été ajouté pour entrainer les solvants à travers le système. L'assèchement de la colonne provoqué par ces injections n'a entraîné aucune modification dans les rendements d'élution de la colonne ( $p=0,25$  ;  $n=11$ ).

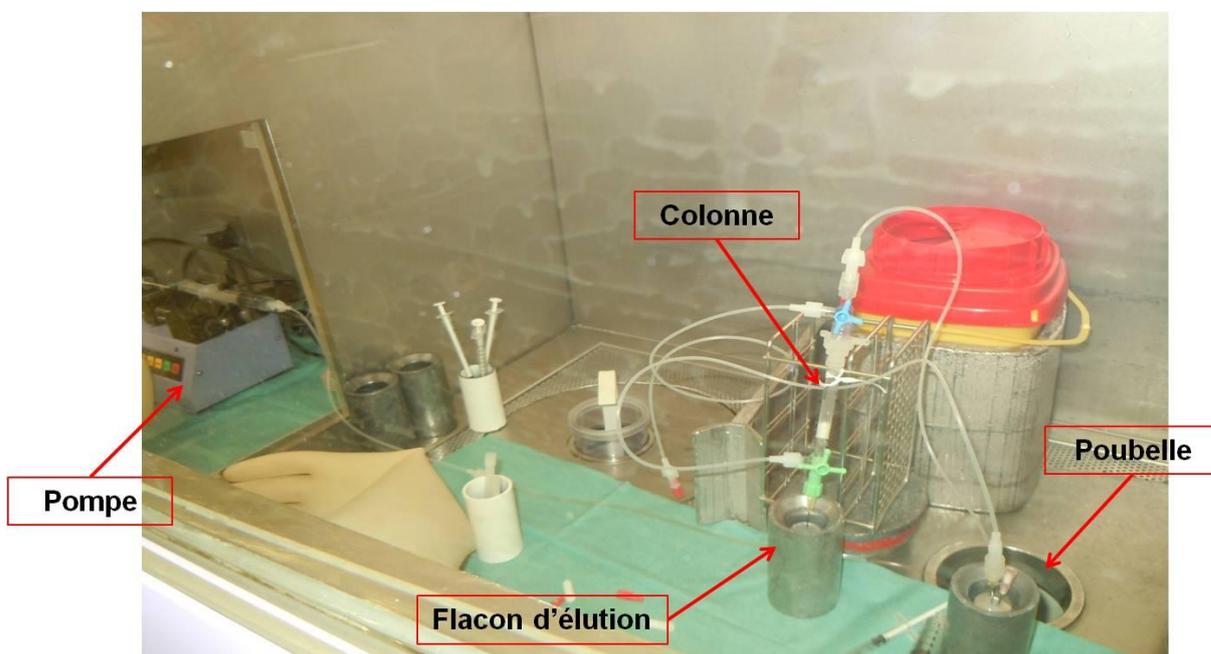


Figure 43. Illustration du circuit d'élution du générateur  $^{68}\text{Ge} / ^{68}\text{Ga}$

Une étude de poste a été réalisée pour évaluer la dose prise aux extrémités et au corps entier avec et sans le dispositif. Cette étude est détaillée pour chaque étape de la synthèse. En premier lieu, le risque d'exposition externe est principalement et surtout lié aux

**Résultats – Apport du circuit et caractérisation du générateur**

rayonnements  $\gamma$ . Il existe un très faible risque de contamination interne par inhalation, le  $^{68}\text{Ga}$  étant très peu volatil les composés chimiques DOTA et HBED étant non volatils.

Une valeur de temps, de distance, de blindage et du nombre de répétition a été estimée pour chaque manipulation et pour une activité constante de 200 MBq (tab. 17).

Étapes de synthèse	Mode manuel			
	Distance (m)	Temps (min)	Blindage (mm)	Nombre de répétition
Élution du générateur	0,3	2,5	0	1
Purification éluat	contact	1	0	3
Passage activimètre	0,3	0,08	0	8
Prélèvement de l'échantillon	contact	0,5	0	1
Manipulation des robinets	-	-	-	-

Étapes de synthèse	Mode semi-automatique			
	Distance (m)	Temps (min)	Blindage (mm)	Nombre de répétition
Élution du générateur	1	2,5	50	1
Purification éluat	0,5	1	50	3
Passage activimètre	0,3	0,08	0	8
Prélèvement de l'échantillon	contact	0,5	0	1
Manipulation des robinets	contact	0,15	0	2

**Tableau 17. Estimations des paramètres pour le calcul des débits de dose**

Étapes de synthèse	$H_T$ sans circuit (mSv)	$H_T$ avec circuit (mSv)
Élution du générateur	0,02	5,17E-06
Purification éluat	6,11	0,61
Passage activimètre	0,00	2,48E-05
Prélèvement échantillon	1,02	4,74E-03
Manipulation robinet	-	1,02
$H_T$ totale	<b>7,15</b>	<b>1,63</b>

**Tableau 18. Dose équivalente prise aux mains pour une synthèse**

### **Résultats – Apport du circuit et caractérisation du générateur**

Sans le circuit, l'étape critique est la purification de l'éluat (tab. 18). En effet, l'élution de la colonne et les différentes étapes d'injection d'air sont réalisées au contact même de la source. Le temps pour chaque étape est d'environ 1 min. Avec le circuit, la présence des tubulures de 50 cm diminue le débit de dose d'un facteur 10. L'étape critique devient la manipulation des robinets qui est réalisée manuellement.

La dose effective corps entier durant la synthèse est similaire pour les deux modes (manuel ou semi-automatique) à environ  $1,4 \cdot 10^{-8}$  mSv. La présence de l'enceinte, de la brique de Pb et du pot plombé freine efficacement les rayonnements  $\gamma$ .

**Au final, l'apport du circuit est très importante puisqu'elle permet de réduire la dose prise aux mains d'un facteur 7. Elle reste cependant élevée à plus de 1 mSv pour chaque radiomarquage.**

Le générateur est produit par le cyclotron russe d'Obnisk. Ces générateurs étant uniquement réservés à un usage préclinique, l'éluat de  $^{68}\text{Ga}$  n'est pas régi par la PhE. De ce fait, aucun contrôle libératoire défini par la monographie de l'éluat de  $^{68}\text{Ga}$  sur la contamination par le  $^{68}\text{Ge}$ , le Zn ou le Fe n'a été réalisé au cours de nos études.

La caractérisation du générateur a été réalisée en comparant les données expérimentales aux données fournies par les spécifications du fournisseur.

Ainsi, pour nos travaux, deux générateurs d'une activité de 370 MBq à la date de calibration ont été nécessaires. L'activité choisie permettait de limiter l'activité manipulée et ainsi la dosimétrie de l'opérateur. L'activité initiale corrigée de la décroissance pour le premier générateur était de 251 MBq et celle du deuxième était de 288 MBq. Les spécifications du générateur donnaient une activité éluee d'au moins 70 % de l'activité de calibration à la première élution (soit 259 MBq). Celle-ci n'a donc pas été respectée pour le premier générateur.

D'autre part, les spécifications donnaient une activité minimale de 45 % de l'activité après 3 ans ou 400 élutions. Pour le premier générateur, une diminution de l'activité de 50 % a été observée en 168 jours d'utilisation soit environ 5 mois. Celle-ci correspondait à un nombre total de 77 élutions. Pour le deuxième générateur, la diminution de l'activité totale était de

### Résultats – Apport du circuit et caractérisation du générateur

33 % après 86 jours d'utilisation du générateur (soit 72 éluions). Rapportée au nombre d'éluions, la diminution d'activité du 2ème générateur était inférieure à celle observée pour le premier générateur (fig. 44). Elle restait cependant supérieure à la spécification annoncée par le fabricant, représentée par la courbe de l'activité attendue sur la figure 44 (en prenant comme activité initiale 259 MBq soit 70 % de l'activité à la date de calibration du générateur).

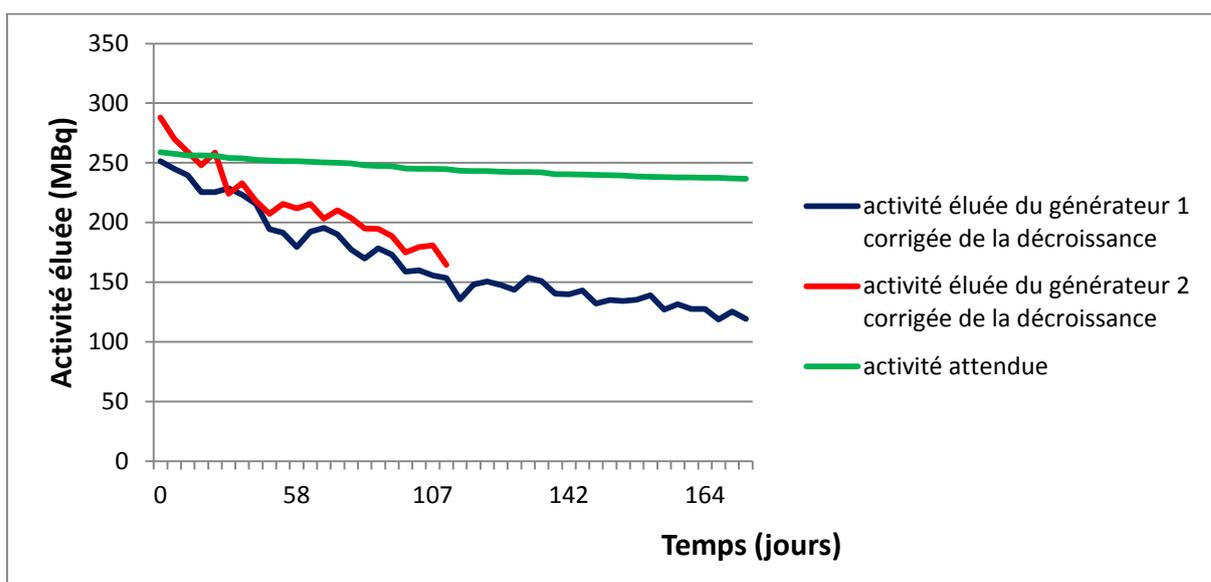


Figure 44. Évolution de l'activité des générateurs au cours du temps

Afin de comprendre la perte importante d'activité au cours du temps pour nos générateurs, deux études ont été menées en parallèle.

Une étude, portant sur l'activité éluee 4h après la première éluion, a été réalisée avec le premier générateur. Elle avait pour but de vérifier une possible augmentation de la rétention du  $^{68}\text{Ga}$  sur la colonne du générateur. Pour cela, les activités théoriques étaient calculées à l'aide de l'abaque du générateur  $^{68}\text{Ge} / ^{68}\text{Ga}$  (fig. 23) et comparées aux activités éluees 4 h après la première éluion. Les résultats montrent que le pourcentage de l'activité éluee reste stable à  $94,1\% \pm 3\%$  de l'activité théorique ( $n=35$ ). Aucune diminution significative de l'activité éluee 4h après la première éluion n'a été observée en 7 mois par rapport à l'activité théorique. De ce fait, une rétention accrue du  $^{68}\text{Ga}$  sur la colonne paraît donc peu probable.

### Résultats – Apport du circuit et caractérisation du générateur

L'autre étude portait sur l'augmentation possible de la fuite de  $^{68}\text{Ge}$  pour des générateurs en fin de vie (8 à 12 mois en moyenne d'après la littérature) et pouvant également expliquer la perte d'activité observée au cours du temps. Pour cela, une mesure de la contamination de  $^{68}\text{Ge}$  dans l'éluat de  $^{68}\text{Ga}$  a été réalisée avec un générateur Obninsk d'activité 1,85 GBq âgés de 10 mois. Les résultats montrent que la contamination moyenne sur un éluat non purifié est de  $0,0038133 \% \pm 2,27388\text{E-}05 \%$  de l'activité totale en  $^{68}\text{Ga}$  dans l'éluat ( $n = 3$ ). Ces résultats sont inférieurs à la spécification puisque la contamination du  $^{68}\text{Ge}$  dans l'éluat ne doit pas excéder  $0,005 \%$  de l'activité totale en  $^{68}\text{Ga}$ .

**La caractérisation du générateur a donc mis en évidence que la diminution de l'activité éluee au cours du temps était supérieure aux spécifications. Les deux études portant sur les causes possibles d'une diminution de cette activité, n'ont pas permis de confirmer l'une ou l'autre des hypothèse. Cependant, l'étude de la contamination par le  $^{68}\text{Ge}$  n'a pas été réalisée avec nos générateurs de 370 MBq et limite l'interprétation des résultats.**

## **II.B Études sur les techniques de purification de l'éluat de $^{68}\text{Ga}$**

De nombreuses techniques ont été décrites pour purifier l'éluat de  $^{68}\text{Ga}$  de ses contaminants métalliques et du  $^{68}\text{Ge}$ . Au départ, des essais de purification par fractionnement ont été réalisés. La moyenne des rendements d'élution était de  $96,9 \% \pm 1,54 \%$  ( $n = 3$ ). Cependant, pour obtenir un rendement supérieur à  $90 \%$  de l'activité totale éluee, la fraction de tête devait être de 1,5 mL et la fraction 2 de 2,5 mL. Pour réduire le volume de l'éluat, une répartition différente des fractions a été testée. L'augmentation du volume de la première fraction à 2,5 mL et une diminution du volume de la fraction 2 à 1,5 mL diminuait l'activité d'environ  $40 \%$  ( $n = 4$ ). De plus, l'éluat étant en HCl 0,1 M pour un volume de 1,5 mL, le pH de l'éluat était trop faible pour permettre la réaction de radiomarquage. Afin d'augmenter le pH à une valeur cible de 3,8 – 4, un volume très important d'un tampon concentré en sel a donc été nécessaire. De ce fait, pour conserver un volume d'éluat suffisamment faible, maintenir une activité éluee supérieure à  $90 \%$  et

### **Résultats – Études sur les techniques de purification de l'éluat de $^{68}\text{Ga}$ – Optimisation de la technique d'échange cationique de Ocak**

adapter le solvant à la réaction de radiomarquage, cette technique a été rapidement abandonnée au profit de la purification par échange cationique.

Le choix de la méthode de purification par échange cationique a été déterminé par sa simplicité technique. En effet, l'éluat issu du générateur est directement transféré sur la colonne de purification ce qui limite les manipulations et réduit les pertes.

#### **II.B.1 Optimisation de la technique par échange cationique de Ocak**

Dans notre système, la technique de Ocak a été étudiée comme première méthode d'élution car celle-ci était la plus documentée et servait de référence en clinique avec les analogues de la somatostatine. Pour rappel, la purification de l'éluat est réalisée par une colonne échangeuse de cations avec un mélange acétone / HCl comme solvant d'élution. Pour des raisons de disponibilité, la colonne Oasis MCX a été choisie à la place de la colonne Strata X-C proposé par Ocak et al. L'optimisation de cette méthode a porté sur le pré-conditionnement de la colonne et la diminution du volume d'élution.

Au départ, la colonne n'était pas préconditionnée comme le décrivait l'équipe de Ocak. Lors des 3 premiers essais d'élution avec la même colonne, le rendement d'élution chutait de 94 % à 2,4 %. De plus, une variation du rendement d'élution à la première utilisation était observée pour 4 colonnes neuves différentes allant de 94 % à 85,4 %. Un lavage de la colonne a donc été systématiquement réalisé par 1 mL d'HCl 5M (soit 1 volume de colonne) suivi d'un rinçage par 3 mL d'eau UP (soit 3 volumes de colonne).

La méthode décrite par Ocak nécessitait une première étape d'élution de la colonne par 800  $\mu\text{L}$  d'un mélange d'acétone / HCl 0,002M (98:2) suivie d'une étape de rinçage par 3 mL d'eau UP. La moyenne des rendements mesurés était de  $91,7\% \pm 2,8\%$  de l'activité totale éluee ( $n=8$ ). Le volume d'élution final était de 3,8 mL.

Dans notre protocole, une évaporation de l'acétone était obligatoire pour réaliser la réaction de radiomarquage. En effet, le volume de la solution contenant le chélatant était très faible. L'ajout d'un grand volume d'acétone risquait d'interférer dans la réaction de radiomarquage. L'évaporation devait donc précéder l'addition de la solution de chélatant et devait être complète.

L'étude a donc tout d'abord portée sur l'évaporation de l'acétone.

**Résultats – Études sur les techniques de purification de l'éluat de  $^{68}\text{Ga}$  – Optimisation de la technique d'échange cationique de Ocak**

A  $90^\circ\text{C}$ , le temps de chauffage de l'éluat pour évaporer l'acétone était difficile à évaluer et la quantité résiduelle d'acétone n'était pas dosable. En 30 min, l'évaporation du solvant d'éluat était faible.

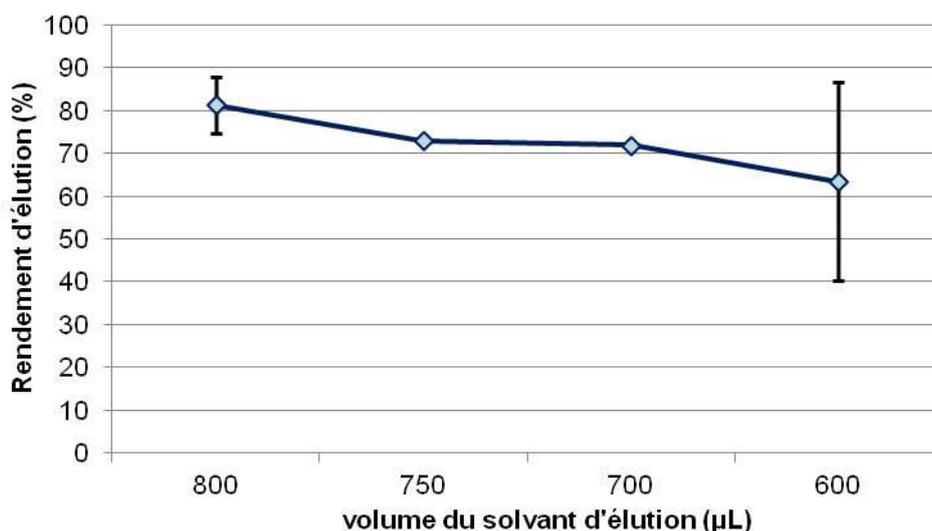
Pour réduire le volume à évaporer et limiter ainsi la durée totale de l'expérience, un essai sans le rinçage final de la colonne avec 3 mL d'eau a été testé.

La moyenne des rendements d'éluat était de  $81,4\% \pm 6,5\%$  ( $n=6$ ) de l'activité totale en  $^{68}\text{Ga}$  pour un volume final de  $800\ \mu\text{L}$ . La suppression de l'étape de rinçage entraîne donc une réduction significative du rendement d'éluat ( $p = 0,002$ ).

Suite à ces résultats, une diminution du volume d'acétone / HCl a également été évaluée toujours en conservant l'étape de rinçage.

Les résultats montrent que le rendement d'éluat est inférieur à  $80\%$  pour un volume de  $700\ \mu\text{L}$  et inférieur à  $70\%$  pour un volume de  $600\ \mu\text{L}$  (moyenne à  $63\% \pm 23\%$ ,  $n=3$ ) (fig. 45).

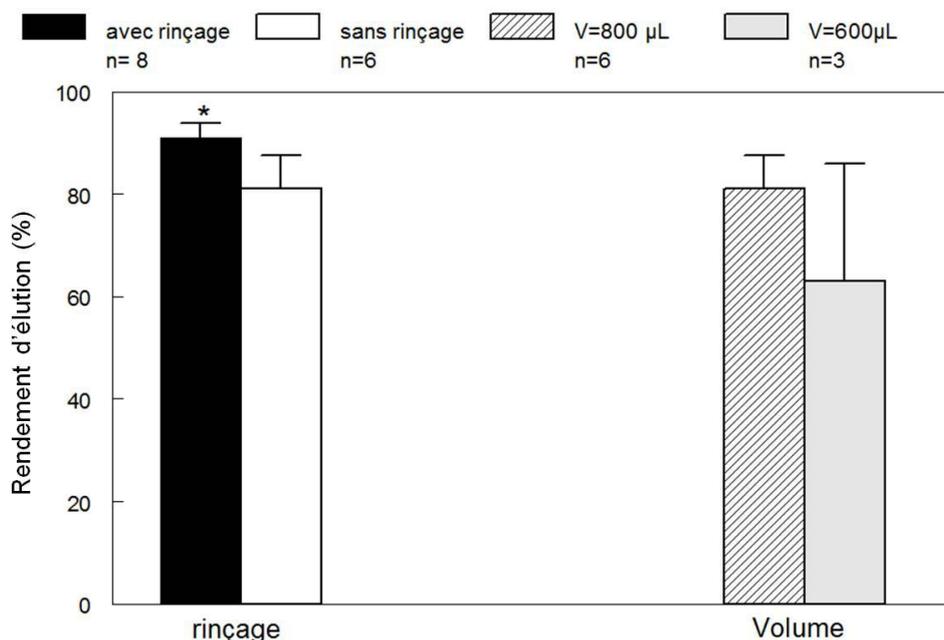
Cette diminution du volume d'éluat entraîne une réduction non significative du rendement d'éluat ( $p = 0,15$ ).



**Figure 45. Évolution du rendement d'éluat en fonction du volume de solvant**

L'ensemble de ces études montrent que le rinçage de la colonne MCX par l'eau est le facteur prédominant dans le rendement d'éluat de la colonne (fig 46).

**Résultats – Études sur les techniques de purification de l'éluat de  $^{68}\text{Ga}$  – Optimisation de la technique d'échange cationique de Ocak**



**Figure 46. Évolution des rendements d'éluat en fonction du volume total d'éluat**

Cependant, pour les raisons évoquées précédemment sur la durée de l'étape d'évaporation du solvant d'éluat d'une part et la nécessité de réaliser cette étape avant l'étape de radiomarquage d'autre part, le rinçage par l'eau a été supprimé afin de réduire le volume d'éluat de 3,8 mL à 800 µL.

Ainsi, pour un volume d'éluat purifié de 800 µL, la durée de l'étape d'évaporation est réduite à 10 min. Lors de l'étude, il a été observé que cette étape n'était pas reproductible et que des volumes résiduels de solvant étaient régulièrement observés. De plus, l'étape supplémentaire d'évaporation augmentait le temps de synthèse ce qui réduisait l'activité de  $^{68}\text{Ga}$  disponible pour l'étape de radiomarquage.

**L'acétone ne semblait donc pas être le solvant optimal dans notre système**

Afin de minimiser le temps de purification de l'éluat, un changement de solvant a été proposé. Le solvant acétone a été remplacé par des tampons de faible salinité compatibles avec la solution de marquage. Des essais ont été réalisés avec le tampon acétate de sodium 50 mM pH 4,8, le tampon phosphate de potassium 100 mM pH 5 et le tampon citrate de sodium 100 mM pH 5. L'éluat était réalisée avec 800 µL de tampon sans rinçage. Les résultats sont présentés dans le tableau 19.

**Résultats – Études sur les techniques de purification de l'éluat de  $^{68}\text{Ga}$  – Optimisation de la technique d'échange cationique de Ocak**

Tampons	rendement moyen d'élution (%)	Ecart types (%)
acétate de Na 50mM pH 4,8 (n=3)	25,8	34,5
citrate de Na 100mM pH 5 (n=2)	98,1	0,49
phosphate de K 100mM pH 5 (n=3)	29,3	32,6

**Tableau 19. Essai de purification de l'éluat par des tampons acides**

Les tampons ont été choisis sur différents critères : leur pKa entre 5 et 6 et leur pouvoir chélatant. En effet, le pKa de ces tampons laissent supposer que l'effet sur le pH de l'éluat en HCl serait suffisant pour augmenter le pH à 3,8 et qu'associé à leur faible pouvoir chélatant, ces tampons limiteraient la formation de colloïdes de  $^{68}\text{Ga}$  sans pour autant interférer lors de la réaction de radiomarquage.

Au final, les résultats montrent que le pH des éluats purifiés est bien inférieur à 3,5 pour l'ensemble des tampons. De plus, l'acétate de sodium et le phosphate de potassium ne possèdent pas un pouvoir chélatant suffisant pour éluer de façon reproductible le  $^{68}\text{Ga}$ .

Le citrate de sodium, qui est déjà utilisé en clinique avec le  $^{67}\text{Ga}$  en imagerie monophotonique, permet l'élution du  $^{68}\text{Ga}$  avec un rendement de  $98,1\% \pm 0,49\%$  ( $n = 2$ ). Sa concentration est insuffisante pour atteindre le pH cible de 3,8 nécessaire au radiomarquage. Une concentration d'ions citrates plus importante n'était pas envisageable car une forte concentration provoquait une diminution importante des rendements de radiomarquage en raison du pouvoir complexant des ions citrates pour le Ga.

Pour notre technique, le volume d'élution reste également trop important à 800  $\mu\text{L}$ .

**Suite à ces résultats, les tampons n'ont donc pas été conservés pour l'élution du  $^{68}\text{Ga}$  à partir d'une colonne d'échange cationique.**

**II.B.2 Optimisation de la méthode d'échange cationique de Mueller**

Durant l'étude, une technique de purification par échange cationique a été présentée par Mueller et al. Elle utilisait un mélange NaCl 5 M contenant 2,73 % d'HCl 5,5 M comme solvant d'élution. Le NaCl concentré proposé comme solvant d'élution possède de nombreux avantages : compatibilité avec la solution de radiomarquage, obtention du  $^{68}\text{Ga}$  sous la

**Résultats – Études sur les techniques de purification de l'éluat de  $^{68}\text{Ga}$  – Optimisation de la technique d'échange cationique de Mueller**

forme de tétrachlorure de Ga ( $[\text{GaCl}_4]^-$ ) optimale pour la réaction de complexation et un faible volume d'éluat. L'éluat purifié reste cependant à un pH très acide défavorable à la réaction de complexation. La solution apportée par Mueller et al. résident dans l'ajout d'un tampon acétate de sodium concentré à 1 M lors de l'étape de radiomarquage. En effet, l'acétate augmente le pH de la solution à un pH de 3,5 – 4, idéal pour la complexation du  $^{68}\text{Ga}$  avec son chélatant, tout en limitant la formation de colloïdes.

Les premiers essais reprenaient le protocole décrit par Mueller et al. : une solution de 550  $\mu\text{L}$  de NaCl 5 M acidifié par 2,27 % d'HCl 5,5 M éluait la colonne SCX préalablement pré-conditionnée. Avec cette technique, le rendement moyen d'éluat était de 99,65 %  $\pm$  0,25 % (n = 12).

Cependant, les résultats d'éluat excellents étaient cependant contrebalancés par l'osmolarité de la solution de marquage. En effet, la concentration en ions  $\text{Na}^+$  de l'éluat purifié s'ajoutait à celle de la solution tampon d'acétate de sodium 1 M. Au final, l'osmolarité de la solution était de 7,87 Osmol/L (pour  $i = 2$  et  $\phi = 1$  pour le NaCl et l'acétate de Na). Sans une dilution extrêmement importante ou un changement de solvant, la solution ne pouvait pas être injectée par voie IV en bolus à un animal. Chez l'homme, l'osmolarité maximale autorisée en IV par voie périphérique est de 700 mOsmol / L. En prenant cette référence pour l'injection chez l'animal, la solution était très hypertonique (1000 fois supérieure à l'osmolarité limite). Outre la douleur insupportable lors de l'injection, une plasmolyse complète aurait entraîné la mort de l'animal.

Le but des différentes études a donc été de réduire l'osmolarité de la solution de marquage. Certaines contraintes ont été préalablement définies :

- le rendement d'éluat de la colonne de purification devait être supérieur à 95 %
- l'osmolarité de la solution injectable de complexe devait être de 700 mOsmol/L

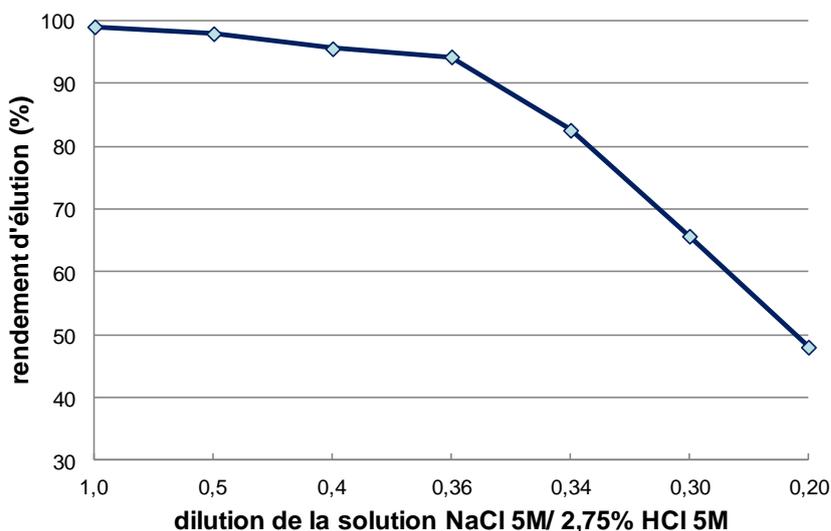
Plusieurs conditions ont donc été modifiées afin d'optimiser la technique : les concentrations en NaCl, le pourcentage en HCl 5 M et le volume d'éluat.

Le premier essai a porté sur la réduction de la concentration de la solution de NaCl. Une dilution du solvant d'éluat a été réalisée. Les concentrations de NaCl étaient fixées à 2,5 M,

**Résultats – Études sur les techniques de purification de l'éluat de  $^{68}\text{Ga}$  – Optimisation de la technique d'échange cationique de Mueller**

2M, 1,8 M, 1,7 M, 1,5 M et 1 M. Les dilutions successives du solvant d'éluion diminuaient le pourcentage d'HCl 5 M qui était de 1,37%, 1,1 %, 0,99%, 0,91%, 0,82% et 0,55%.

L'évolution des rendements d'éluion est présentée sur la figure 47.



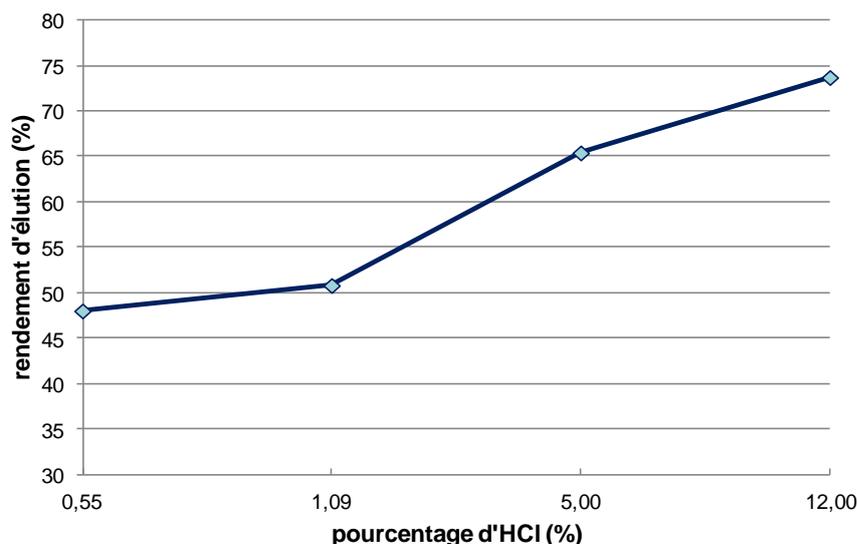
**Figure 47. Évolution du rendement en fonction de la concentration du solvant**

Pour les concentrations de NaCl allant de 5 M à 1,8 M, le rendement d'éluion était supérieur à 90 % de l'activité totale élue. Puis pour des concentrations en NaCl plus faibles, celui-ci chutait rapidement jusqu'à 49 %.

**Ces résultats montrent qu'une concentration minimale de 1,8 M de NaCl était nécessaire pour conserver un rendement d'éluion supérieur à 95 %.**

Pour vérifier que la diminution de l'acidité du solvant n'était pas la cause principale de la diminution observée lors de l'essai précédent, une augmentation du pourcentage d'HCl 5 M a également été réalisée avec une concentration fixée en NaCl de 1 M. Les pourcentages étudiés étaient de 0,55 %, 1,09 %, 5,00 % et 12,00 %. Comme le montre la figure 49, l'augmentation de l'acidité du solvant améliore le rendement d'éluion mais de façon modérée.

**Résultats – Études sur les techniques de purification de l'éluat de  $^{68}\text{Ga}$  – Optimisation de la technique d'échange cationique de Mueller**



**Figure 48. Évolution du rendement d'éluat en fonction du pourcentage d'HCl 5 M**

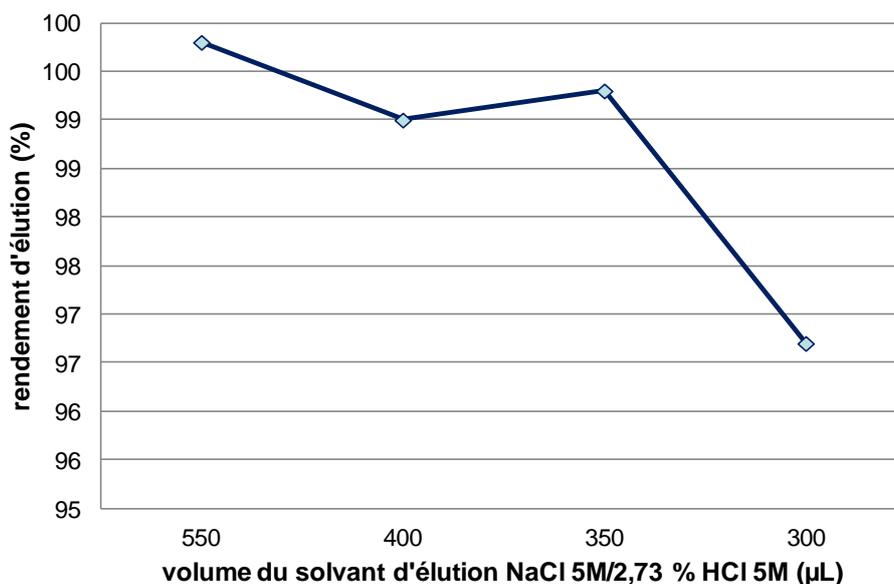
En effet, une augmentation de 5 fois le pourcentage en HCl 5 M accroît le rendement d'éluat de 10% seulement alors que celui-ci est augmenté de plus de 50 % pour une augmentation de 5 fois la concentration en NaCl.

**Il est donc nécessaire de conserver une concentration en NaCl élevée pour éluer efficacement la colonne échangeuse de cations.**

Enfin, pour évaluer l'effet de la diminution du volume d'éluat sur le rendement, une réduction du volume du solvant a été testée.

L'étude de la réduction des volumes d'éluat de 550  $\mu\text{L}$  à 300  $\mu\text{L}$  de NaCl 5 M contenant 2,73 % d'HCl 5 M montre que le rendement reste constant à 99 % si le volume est supérieur à 350  $\mu\text{L}$  (fig. 48)

**Résultats – Études sur les techniques de purification de l'éluat de  $^{68}\text{Ga}$  – Optimisation de la technique d'échange cationique de Mueller**



**Figure 49. Évolution du rendement d'éluat en fonction du volume d'éluat**

**Le volume de solvant doit donc être supérieur à 350 µL pour conserver un rendement d'éluat suffisant.**

Suite à ces résultats, un essai de reproductibilité avec une concentration en NaCl de 2 M pour un pourcentage d'HCl 5 M à 2,75 % et pour un volume d'éluat de 400 µL, a montré que ses conditions étaient suffisantes pour maintenir le rendement d'éluat à 95 %. Dans ce cas, la moyenne des rendements d'éluat est de 95,66 %  $\pm$  1,69 % (n = 93).

La réduction de la concentration en NaCl à 2 M entraîne cependant une réduction significative du rendement d'éluat par rapport à la concentration de 5 M décrite par Mueller ( $p = 0,006$ ).

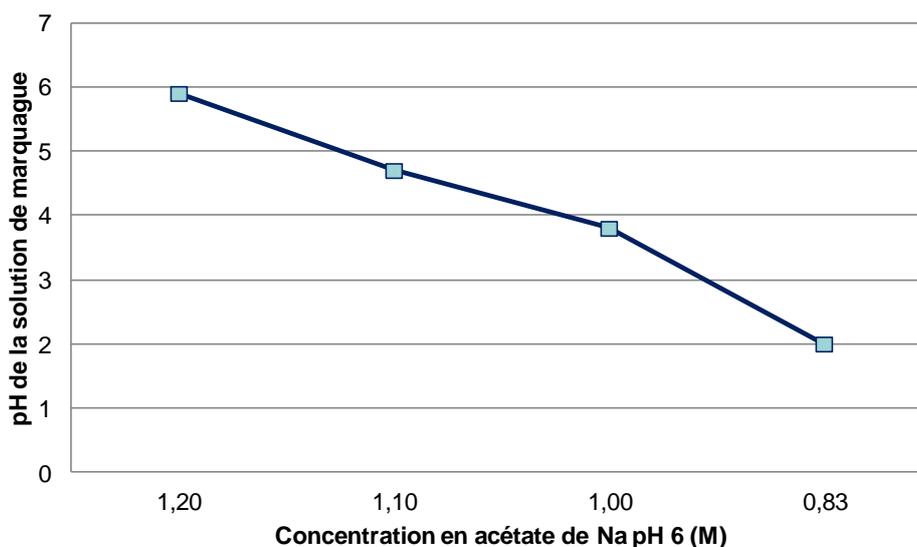
**La diminution du rendement d'éluat pour un solvant contenant 2 M de NaCl avec 2,75 % d'HCl 5M et pour un volume réduit à 400 µL, est donc acceptable au vu de la réduction importante de l'osmolarité de la solution de marquage à 3,8 Osmol / L.**

Pour réduire encore l'osmolarité de la solution de marquage, une étude sur le tampon de marquage a été menée. En effet, l'acétate de sodium est à une concentration finale de 0,4 M et impacte également l'osmolarité de la solution.

**Résultats – Études sur les techniques de purification de l'éluat de  $^{68}\text{Ga}$  – Optimisation de la technique d'échange cationique de Mueller**

Un essai sur la diminution de la concentration du tampon de marquage a donc été réalisé. L'effet de cette diminution sur le pH de la solution a été évalué.

Pour réaliser l'étude, un volume de 250  $\mu\text{L}$  d'acétate de sodium pH 6 de concentration de 1,20 M, 1,10 M, 1,00 M et 0,83 M a été ajouté à 400  $\mu\text{L}$  d'éluat en NaCl 2 M / 2,75 % HCl 5M. (fig. 50)



**Figure 50. Effet de la concentration du tampon sur le pH de la solution de marquage**

Théoriquement, pour une concentration en tampon acétate de 1 M, le pH de la solution de radiomarquage devrait être de 5,15 et il devrait être de 5,09 pour une concentration de 0,8 M. Expérimentalement, les mesures de pH sont beaucoup plus faibles. Les résultats montrent que l'acétate de sodium 1 M pH 6,00 est nécessaire pour obtenir un pH cible de 3,80 – 4,00. Une réduction de la concentration du tampon de 0,2 M fait chuter le pH de la solution de marquage à 2,00. Cette différence entre le pH théorique et la valeur expérimentale est expliquée par la présence d'HCl résiduel sur la colonne et par les échanges entre les ions hydroniums de la colonne et les ions  $\text{Na}^+$  du solvant d'éluat. La concentration en ions hydroniums lors de l'éluat est variable d'un essai à l'autre et rend difficile sa quantification. Cependant, celle-ci est suffisamment importante pour avoir un impact sur le pH de la solution de radiomarquage.

**Résultats – Études sur les techniques de purification de l'éluat de  $^{68}\text{Ga}$  – Optimisation de la technique d'échange cationique de Mueller**

**L'ensemble des résultats, sur l'optimisation de la technique de purification par échange cationique de Mueller, a donc permis de réduire l'osmolarité de la solution de marquage à 3,23 Osmol / L pour un volume de 650  $\mu\text{L}$ .**

Afin d'obtenir une osmolarité de 700 mOsmol / L, une étape de dilution finale à 3 mL est réalisée par du NaCl 0,9 %. Afin que le pH de la solution injectée soit de 6,8 – 7, la solution diluante est basifiée par 2,00 % de NaOH 5 M.

Ce procédé de purification de l'éluat et l'ajout d'une étape finale de dilution ont ensuite été appliqués pour l'ensemble des études de radiochimie avec les chélatants DOTA et HBED.

### **II.B.3 Études des contaminants métalliques dans l'éluat purifié**

Les techniques de purification de l'éluat n'ont jamais été comparées entre elles et il existe peu de données sur l'efficacité de purification de ces méthodes. Pour choisir la méthode de purification, différentes comparaisons entre les techniques par fractionnement, par échange anionique et par échange cationique ont donc été réalisées.

Une première étude comparait les données issues des CHU de Nantes et de Grenoble pour la technique de purification par échange cationique utilisant le NaCl (dit de Mueller).

Comme le montre le tableau 20, des différences significatives (S) pour l'Al, le Zn et le Fe sont retrouvées pour la méthode de Mueller entre les données du CHU de Nantes et du CHU de Grenoble.

Une hypothèse pour expliquer ces différences surprenantes était que le type de récipient utilisé n'était le même entre les deux sites. Dans le cas de Nantes, le flacon était préalablement lavé par de l'HCl alors qu'il ne l'était pas à Grenoble. La forte concentration de métaux adsorbés sur le verre pourrait être à la base de ce résultat.

	<b>Mueller Nantes n=14</b>	<b>Mueller Grenoble n=3</b>	<b>comparaison (p)</b>
<b>Al (<math>\mu\text{g} / \text{L}</math>)</b>	159 $\pm$ 141	1746 $\pm$ 567	S (p= 0,008)
<b>Zn (<math>\mu\text{g} / \text{L}</math>)</b>	569 $\pm$ 807	26624 $\pm$ 26631	S (p = 0,008)
<b>Fe (<math>\mu\text{g} / \text{L}</math>)</b>	2179 $\pm$ 4187	43630 $\pm$ 31250	S (p = 0,01)

**Tableau 20. Comparaison des concentrations de métaux pour l'échange cationique**

**Résultats – Études des contaminants métalliques dans l'éluat de <sup>68</sup>Ga**

Ceci est confirmé par la comparaison des données des purifications par fractionnement ou par échange anioniques entre Bordeaux et Grenoble. Les différences sont majoritairement non significatives (NS) (tab. 21 et 22). Pour ces deux sites, aucun traitement du verre par l'acide n'avait été réalisé.

	Fractionnement Nantes n=2	Fractionnement Grenoble n=5	comparaison (p)
Al (µg / L)	3206 ± 2112	885 ± 688	NS (p = 0,12)
Zn (µg / L)	47795 ± 60092	56346 ± 48952	NS (p = 1)
Fe (µg / L)	110 ± 17	3510 ± 6177	NS (p = 0,58)

**Tableau 21. Comparaison des concentrations de métaux pour le fractionnement**

	Anionique bordeaux n=3	Anionique Grenoble n=4	comparaison (p)
Al (µg / L)	3298 ± 948	3092 ± 1370	NS (p = 1)
Zn (µg / L)	136852 ± 29505	110908 ± 77554	NS (p = 0,7)
Fe (µg / L)	684 ± 789	26575 ± 16083	S (p = 0,03)

**Tableau 22. Comparaison des concentrations de métaux pour l'échange anionique**

Pour le CHU de Nantes, la comparaison entre les 3 méthodes de purification par fractionnement, par échange cationique avec l'acétone (dit de Ocak) et par échange cationique avec le NaCl (dit de Mueller) ne fait apparaître aucune différence significative. Ce résultat peut s'expliquer par la faible reproductibilité dans les dosages pour une même technique. Des variations importantes dans les concentrations en métaux sont retrouvées. Les écart-types, très élevés, ainsi que le faible nombre d'échantillons par groupe, sont à la base de la non-significativité de l'ensemble des comparaisons pour l'Al, le Zn ou le Fe.

A Grenoble, la comparaison des 3 méthodes de purification anionique, cationique par NaCl et par fractionnement est également délicate du fait de la grande variation entre les valeurs des concentrations obtenues pour une même technique. Cependant, une différence significative est obtenue pour l'Al et le Fe entre les méthodes par fractionnement et par échange anionique. (tab. 23).

	Fractionnement Grenoble n=5	Anionique Grenoble n=4	comparaison (p)
Al ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	885 $\pm$ 688	3092 $\pm$ 1370	S (p = 0,02)
Zn ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	56346 $\pm$ 48952	110908 $\pm$ 77554	NS (p = 0,32)
Fe ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	3510 $\pm$ 6177	26575 $\pm$ 16083	S (p = 0,04)

Tableau 23. Comparaison des méthodes par fractionnement et par échange anionique

Pour l'ensemble des études sur les contaminants, il est à noter que la comparaison des méthodes de purification est délicate. Les variations dans les concentrations de métaux dans l'éluat purifié rendent les résultats ininterprétables. Ces variations semblent liées essentiellement à une contamination de l'éluat par les métaux désorbés du verre du flacon d'éluat.

Les nouveaux essais devront prendre en compte systématiquement ce facteur de variation et utiliser des récipients adaptés à la sensibilité et à la limite de détection de ces techniques de dosages par spectrométrie de masse.

## II.C Études de complexation des chélatants avec le $^{68}\text{Ga}$

L'HBED et le DOTA ont été choisis pour leur intérêt clinique. En effet, tous deux sont déjà utilisés en clinique et peuvent être considérés comme des chélatants de référence en série acyclique pour l'HBED et en série macrocyclique pour le DOTA. La structure de base qui ne permet pas la conjugaison avec une molécule d'intérêt, a été préférée. En effet, elle permet de comparer directement les deux chélatants et ce, dans les conditions les plus favorables pour la complexation avec le  $^{68}\text{Ga}$ .

Comme pour les études portant sur les méthodes de purification de l'éluat, certains pré-requis inhérents au procédé technique de synthèse ont été fixés :

- l'activité volumique et l'AS devaient être les plus élevées possibles afin que le volume d'injection soit au maximum de 200  $\mu\text{L}$ ,
- le procédé complet de synthèse devait être réalisé en 30 min maximum afin de limiter la perte de radioactivité liée à la courte période physique du  $^{68}\text{Ga}$ .
- le rendement de marquage devait être supérieur à 95 % afin de supprimer l'étape de purification du produit radiomarqué.

## Résultats – Études de complexation des chélatants avec le $^{68}\text{Ga}$ – cinétique de complexation du $^{68}\text{Ga}$ avec l'HBED

Plusieurs conditions de radiomarquage ont été étudiées afin d'optimiser le rendement et éviter la purification du produit fini. Les études ont portées sur :

- le tampon réactionnel : acétate de sodium ou HEPES,
- la quantité de chélatant : 12 nmol, 23 nmol, 46 nmol ou 115 nmol pour augmenter au maximum l'AS du produit
- la température d'incubation : TA, 50 °C ou 95 °C qui devra être la plus faible possible pour être compatible avec la majorité des vecteurs.

Afin de comparer ces conditions, chacune d'elle a été testée séparément.

Les conditions suivantes ont été fixées pour toutes les expériences :

- la purification de l'éluat a été réalisée uniquement par la méthode de Mueller optimisée (400  $\mu\text{L}$  de NaCl 2 M / 2,75 % HCl 5 M)
- Une activité de 200 MBq de  $^{68}\text{Ga}$  (correspondant à la totalité de l'éluat purifié) a été ajoutée à la solution de marquage.
- la solution mère de chélatant a été préparée à la concentration de 2,3 nM
- le temps d'incubation maximal a été de 30 min
- le volume de la solution de marquage a été fixé à 650  $\mu\text{L}$
- l'analyse des complexes a été réalisée avec une colonne C18 Phenomenex Luna de 25 cm de long, de 4.6mm de diamètre intérieur, d'une granulométrie de 5  $\mu\text{m}$  et d'une porosité de 100 Å.

### II.C.1 Cinétique de complexation du $^{68}\text{Ga}$ avec l'HBED

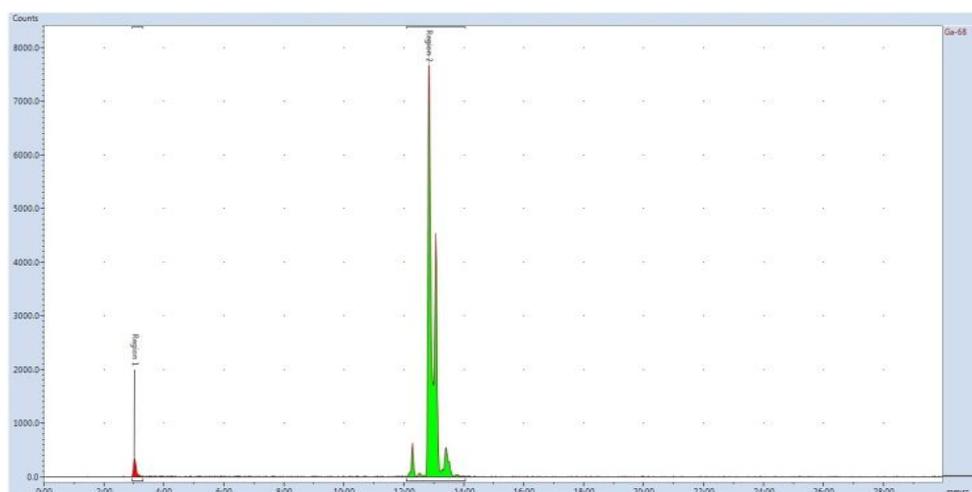
Une cinétique sur 30 min a été réalisée pour l'ensemble des conditions testées. Comme décrit dans la partie matériel et méthode, pour chaque condition, 3 échantillons ont été prélevés à 10 min, 20 min et 30 min et les rendements de radiomarquage ont été calculés. L'activité des échantillons variait de 15 MBq à 30 MBq pour des volumes de 50  $\mu\text{L}$  à 100  $\mu\text{L}$ .

#### II.C.1.a *Cinétique de complexation en acétate de sodium*

En acétate de sodium, la première cinétique reprenait les conditions de température et de quantité de produit décrite majoritairement dans la littérature. A 95°C et pour une quantité de 23 nmol de chélatant, l'HBED complexe rapidement le  $^{68}\text{Ga}$ . Dès le premier

**Résultats – Études de complexation des chélatants avec le  $^{68}\text{Ga}$  – cinétique de complexation du  $^{68}\text{Ga}$  avec l'HBED**

prélèvement à 10 min, le rendement de radiomarquage est à plus de 95 % (fig. 51). L'analyse chromatographique révèle que les complexes acétate- $^{68}\text{Ga}$  sont élués à un temps de rétention très court de  $T_r = 2,53$  min (région 1). Le complexe HBED- $^{68}\text{Ga}$  est élué à un temps de rétention  $T_r = 12,5$  min (région 2). L'augmentation de la durée d'incubation n'entraîne pas de modification majeure de ce rendement (tab. 24).



**Figure 51. Profil chromatographique du complexe HBED- $^{68}\text{Ga}$**

Le temps de rétention des complexes acétate- $^{68}\text{Ga}$  a été confirmé par l'injection de l'éluat en tampon acétate qui donnait le même temps de rétention à  $T_r = 2,50$  min.

Une détermination UV de l'HBED non complexé confirme que le temps de rétention est à  $T_r = 12,5$  min. Le maximal d'absorbance du ligand seul a été déterminé par un balayage entre 220 nm et 480 nm au Nanodrop®. A 225 nm, le coefficient d'extinction molaire est de  $\epsilon = 0,185 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$  ( $R^2 = 0,99$ ). Il correspond au pic majoritaire de la région 2.

En effet, il est important de noter que celle-ci est formée par un groupe de 4 pics. Trois d'entre eux sont peu séparés par CLHP et peuvent correspondre à des stéréoisomères du complexe HBED- $^{68}\text{Ga}$  déjà décrits dans la littérature pour le  $\text{Fe}^{3+}$  (297). Pour le quatrième pic dont le  $T_r = 12,1$  min, il peut s'agir, soit de colloïdes de  $^{68}\text{Ga}$ , soit d'une impureté ayant des propriétés complexantes et issue de la synthèse de l'HBED.

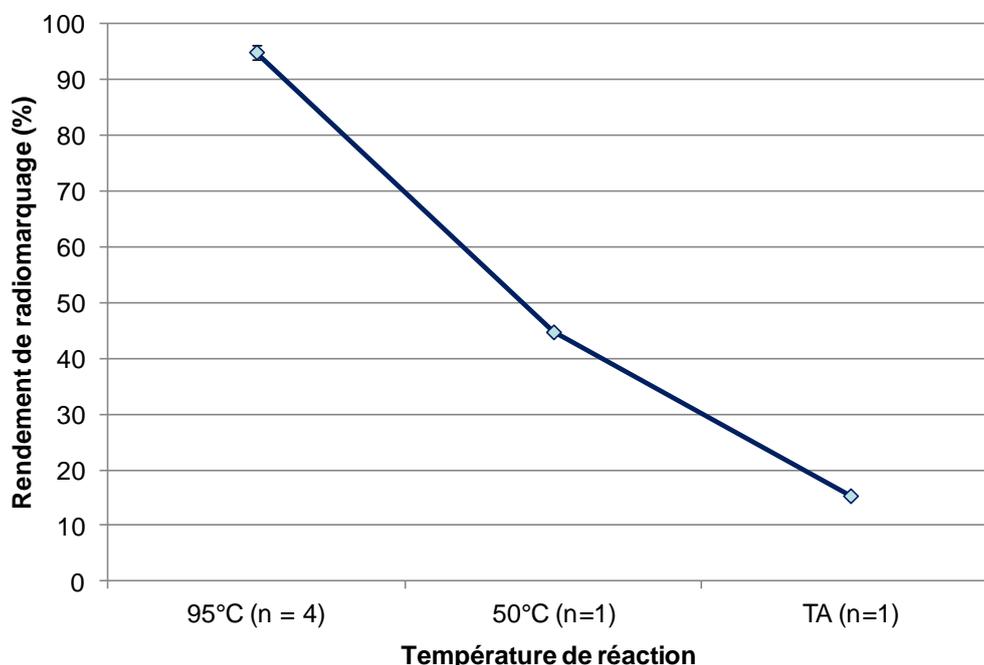
**Résultats – Études de complexation des chélatants avec le  $^{68}\text{Ga}$  – cinétique de complexation du  $^{68}\text{Ga}$  avec l'HBED**

Les autres cinétiques, réalisées à des températures d'incubation de 50°C et à TA, montrent que les rendements des radiomarquages sont plus faibles. L'ensemble des rendements obtenus pour les cinétiques sont présentés dans le tableau 24.

Rendement de radiomarquage (%) (n = 1)			
temps	10 min	20 min	30 min
<b>température</b>			
95°C	97	98	98
50°C	44	58	61
TA	15	16	19

**Tableau 24. Résultats des cinétiques de complexation de l'HBED en acétate**

Pour un temps d'incubation fixé à 10 min, la diminution de la température de réaction entraîne une réduction importante du rendement de radiomarquage (fig. 52).



**Figure 52. Évolution du rendement pour l'HBED- $^{68}\text{Ga}$  en fonction de la température**

Au vu des résultats, la réaction de complexation de l'HBED en tampon acétate est donc optimale pour une température de 95°C et pour une incubation de 10 min.

**Résultats – Études de complexation des chélatants avec le  $^{68}\text{Ga}$  – cinétique de complexation du  $^{68}\text{Ga}$  avec l'HBED**

**II.C.1.b Cinétique de complexation en HEPES**

L'étude de la complexation de l'HBED en tampon HEPES 1 M a été réalisée dans les mêmes conditions.

Le tampon HEPES ne tamponnait pas l'éluat purifié et le pH était inférieur à 3. La cinétique de radiomarquage montrait que le pH était insuffisant pour permettre une réaction complète et un rendement de 60 % était obtenu après 30 min d'incubation à 95°C.

Afin de se trouver dans une zone de pH optimale pour le radiomarquage, le pH a été remonté à 3,5 – 3,8 par l'ajout d'un volume de 10  $\mu\text{L}$  de NaOH 5 M. Dans ces conditions, les rendements de radiomarquage obtenus sont supérieurs à ceux observés avec le tampon acétate (tab. 25).

Rendement de radiomarquage (%) (n = 1)			
temps	10 min	20 min	30 min
température			
95°C	98	99	99
50°C	81	86	90
TA	35	55	67

**Tableau 25. Résultats des cinétiques de complexation de l'HBED en HEPES**

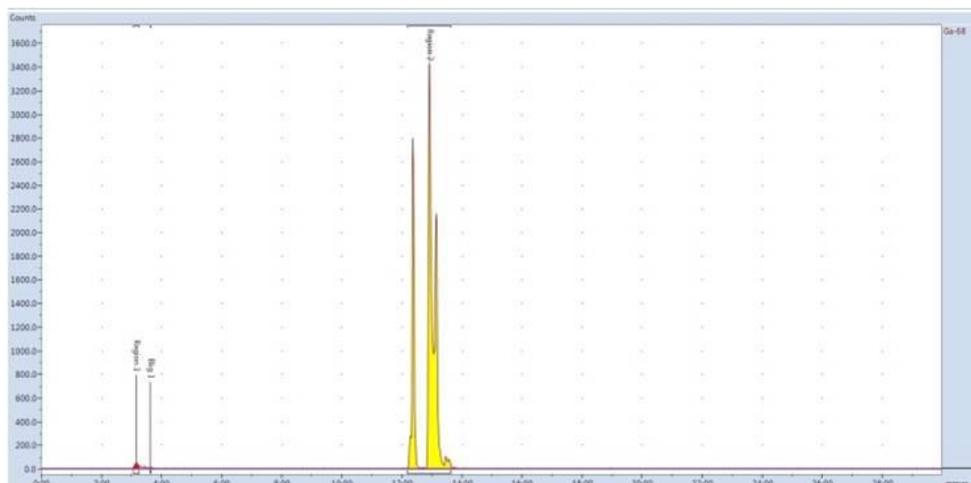
Comme précédemment, la diminution de la température de réaction diminue de façon importante le rendement de radiomarquage. En comparaison avec les résultats en acétate, cette diminution est cependant moins importante notamment à 50 °C où le complexe est formé à 90 % après 30 min d'incubation.

**Les conditions optimales en tampon HEPES pour la complexation de l'HBED et du  $^{68}\text{Ga}$  sont donc les mêmes que celles obtenues en acétate : 95°C, 10 min.**

Les profils chromatographiques obtenus pour l'HBED en HEPES montrent que les temps de rétention du complexe et du  $^{68}\text{Ga}$  non complexé sont identiques à ceux des études en tampon acétate. Comme précédemment, le même nombre de pics pour la région 2 est retrouvé. Une illustration de radiochromatogramme est présentée figure 53. Il correspond à

**Résultats – Études de complexation des chélatants avec le  $^{68}\text{Ga}$  – cinétique de complexation du  $^{68}\text{Ga}$  avec l'HBED**

un radiomarquage en tampon HEPES pour un temps d'incubation de 10 min à une température de 95°C.



**Figure 53. Profil chromatographique du complexe HBED- $^{68}\text{Ga}$  (HEPES, 95°C, 10 min)**

La différence la plus notable réside dans le pourcentage de radioactivité du pic à  $T_r = 12,1$  min. Il était déjà présent en tampon acétate à une valeur de 3,3 % et représente ici un pic d'une valeur de 25,6 % de l'activité injectée.

Pour identifier ce pic à d'éventuels colloïdes de  $^{68}\text{Ga}$ , une analyse chromatographique a été réalisée en mélangeant l'éluat purifié au tampon HEPES 1 M afin d'obtenir un pH à environ 3,8.

La comparaison des pics de l'analyse CLHP montre que les colloïdes forment un pic très large entre 3 min et 4 min mais ne forment pas un pic à 12 min.

De cette analyse, il a été possible de déduire que le pic présent à  $T_r = 12,1$  min est un produit complexé au  $^{68}\text{Ga}$  et non des colloïdes de  $^{68}\text{Ga}$ . Il est probable qu'il s'agisse d'un intermédiaire de complexation de l'HBED- $^{68}\text{Ga}$ .

**L'identification formelle de ce produit n'ayant pas pu être réalisée au cours de l'étude, le tampon HEPES n'a pas été retenu pour les radiomarquages destinés aux études *in vivo*.**

**Résultats – Études de complexation des chélatants avec le  $^{68}\text{Ga}$  – cinétique de complexation du  $^{68}\text{Ga}$  avec l'HBED**

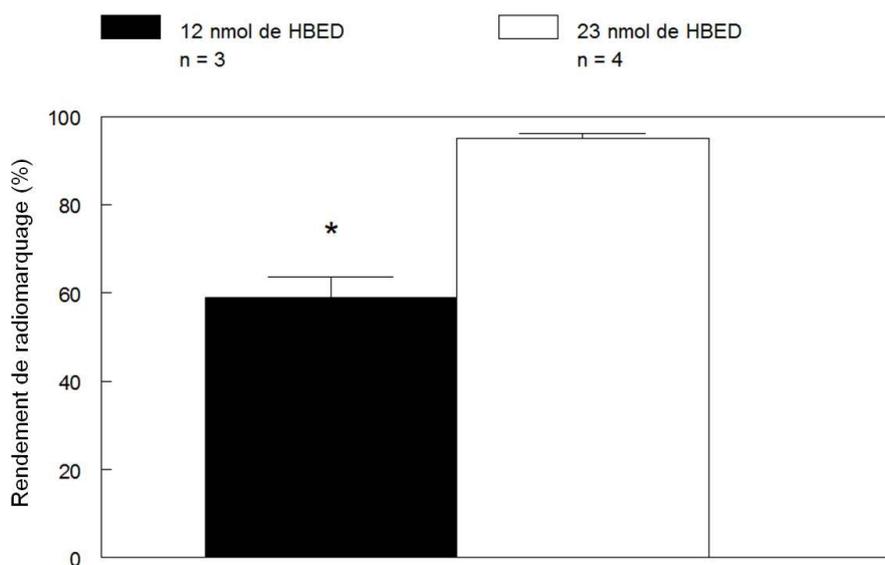
**II.C.1.c Validation des conditions de complexation du  $^{68}\text{Ga}$  avec l'HBED**

La reproductibilité du radiomarquage de l'HBED obtenu en acétate de sodium avec les meilleures conditions de réaction (10min d'incubation à 95°C) a été réalisée. Ces conditions de marquage sont très reproductibles avec un rendement de 95,0%  $\pm$  1,3 % (n = 4).

Dans ces conditions, l'AS est calculée à 8,7 MBq / nmol (pour une quantité de 23 nmol d'HBED).

Pour améliorer l'AS, une diminution de la quantité de chélatant à 12 nmol a été testée dans les conditions de radiomarquage précédemment sélectionnées.

Cette quantité de chélatant diminue significativement le rendement de marquage ( $p = 0,003$ ) (fig. 54). Le rendement est de 59,3 %  $\pm$  4,7 % (n = 3).



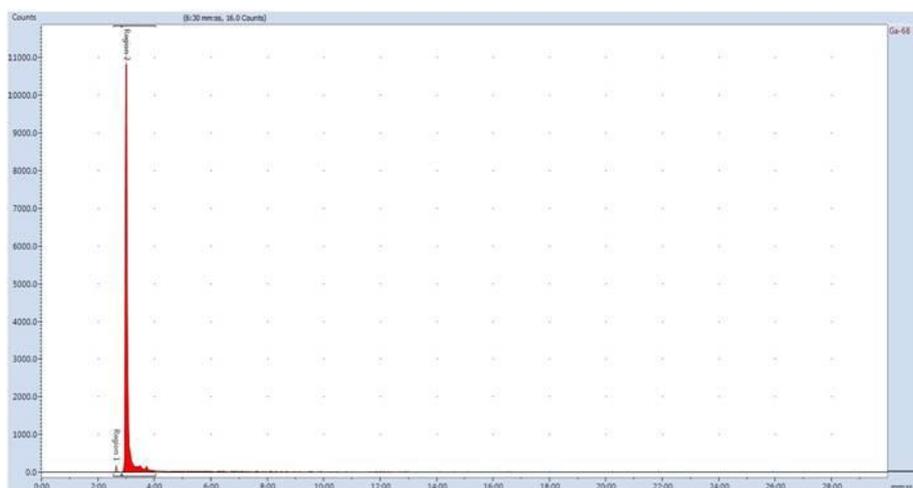
**Figure 54. Comparaison des rendements en fonction de la quantité d'HBED**

En conclusion sur les études avec l'HBED, les conditions optimales de radiomarquage dans notre système sont une incubation à 95°C pendant 10 min avec une quantité de 23 nmol de chélatant en tampon acétate de sodium.

## II.C.2 Cinétique de complexation du $^{68}\text{Ga}$ avec le DOTA

Les études de complexation avec le DOTA n'ont pas été réalisées dans les mêmes conditions que celles de l'HBED. En premier lieu, le DOTA ne possède pas de maximum d'absorbance en UV – visible ce qui a rendu plus complexe l'identification des produits radiomarqués lors des analyses chromatographiques.

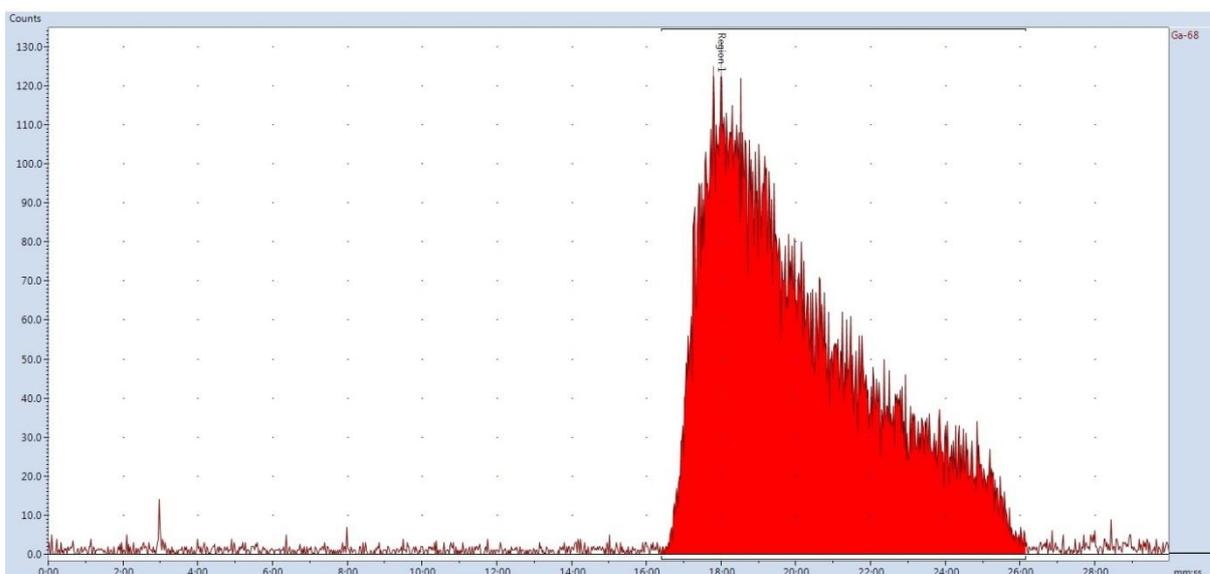
De plus, en utilisant les mêmes conditions d'analyse CLHP que celles de l'HBED, un seul pic est observé sur le radiochromatogramme (fig. 55). Sachant que le temps de rétention à 2,5 min correspond également aux acétate- $^{68}\text{Ga}$ , les pics de DOTA- $^{68}\text{Ga}$  et d'acétate- $^{68}\text{Ga}$  n'ont pu être séparés.



**Figure 55. Profil chromatographique du DOTA- $^{68}\text{Ga}$  avec le protocole CLHP de l'HBED**

De ce fait, afin de séparer le chélatant marqué du  $^{68}\text{Ga}$  « libre », un autre protocole d'analyse a donc été proposé. Pour cela, le gradient de solvant a débuté avec un tampon acétate d'ammonium 50mM à pH 5 qui maintenait le  $^{68}\text{Ga}$  sous la forme de colloïdes, majoritaires à ce pH. En condition isocratique, les colloïdes n'étaient pas élués. L'éluion a été possible par l'ajout d'un pourcentage d'eau UP acidifiée par 0,1 % de TFA. Les colloïdes étant des structures très hétérogènes, le pic de radioactivité obtenu était très large avec un temps de rétention  $T_r = 18$  min au maximum de radioactivité (fig. 56).

**Résultats – Études de complexation des chélatants avec le  $^{68}\text{Ga}$  – cinétique de complexation du  $^{68}\text{Ga}$  avec le DOTA**



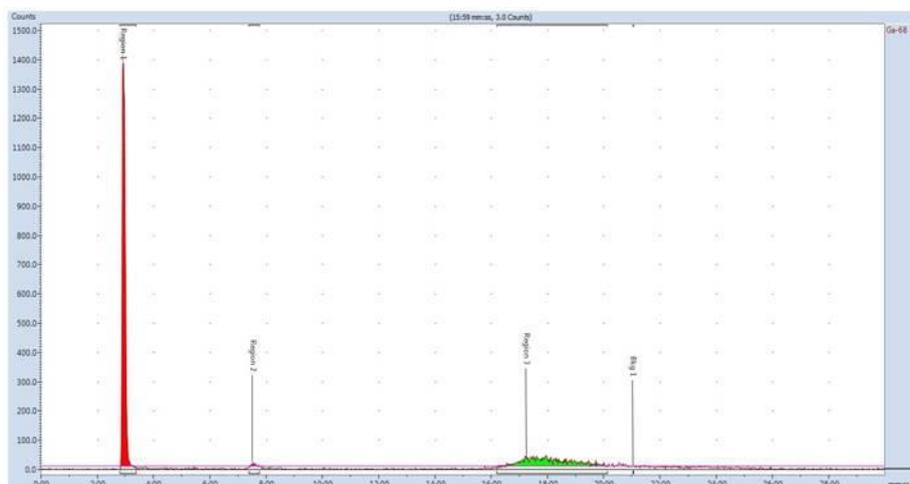
**Figure 56. Profil chromatographique de l'éluat seul avec le protocole CLHP du DOTA**

**II.C.2.a Cinétique de complexation en tampon acétate de sodium**

Dans les conditions identiques à l'HBED, soit en acétate de sodium à 95°C avec une quantité de DOTA de 23 nmol, aucune réaction de complexation n'était observée.

En augmentant la quantité de DOTA à 46 nmol, le rendement de marquage restait faible à 23 % après 30 min d'incubation à 95°C.

Pour une quantité 10 fois supérieure à celle de départ soit de 230 nmol, le rendement de la réaction de complexation du  $^{68}\text{Ga}$  par le DOTA en 10 min à 95°C était de 95 % (fig. 57). L'AS était alors très faible à 0,87 MBq / nmol.



**Figure 57. Profil chromatographique de 230 µg de DOTA- $^{68}\text{Ga}$**

**Résultats – Études de complexation des chélatants avec le  $^{68}\text{Ga}$  – cinétique de complexation du  $^{68}\text{Ga}$  avec le DOTA**

Sel le profil, le temps de rétention du complexe DOTA- $^{68}\text{Ga}$  est de  $T_r = 2,55$  min et le  $^{68}\text{Ga}$  non complexé est élué entre 16,12 min et 20,03 min.

L'optimisation de la quantité de produit a permis de la réduire de moitié sans que cela n'impacte le rendement de radiomarquage.

**Les autres cinétiques ont donc été réalisées avec 115 nmol de produit.**

La cinétique à 50°C a donnée des résultats surprenants. En effet, les rendements de marquages étaient également excellents à plus de 99 % dès 10 min, alors qu'à TA, la réaction de radiomarquage n'avait toujours pas eu lieu après les 30 min d'incubation (tab. 26).

Rendement de radiomarquage (%) (n = 1)			
temps	10 min	20 min	30 min
température			
95°C	99	99	99
50°C	99	99	99
TA	-	-	-

**Tableau 26. Résultats des cinétiques de complexation du DOTA en acétate**

Les résultats obtenus avec la cinétique à 50°C n'étaient pas cohérents avec la littérature où une température d'incubation supérieure à 80°C est nécessaire pour obtenir une totale complexation du DOTA avec le  $^{68}\text{Ga}$  dans une durée compatible avec sa période physique.

Cependant, ces études étaient menées avec des dérivés du DOTA qui ne sont pas identiques au DOTA. De plus, les quantités de dérivés du DOTA étaient beaucoup plus faibles que celle retenue pour nos études. Il paraît donc logique que la plus forte concentration en DOTA contrebalance l'impact d'une plus faible température (50°C au lieu de 95°C).

**Au final dans nos conditions, les résultats montrent que le DOTA est complexé de façon optimale à 50°C avec une durée de l'incubation de 10 min et pour une quantité de 115nmol.**

**Résultats – Études de complexation des chélatants avec le <sup>68</sup>Ga – cinétique de complexation du <sup>68</sup>Ga avec le DOTA****II.C.2.b Cinétique de complexation en HEPES**

Comme dans le cas de l'HBED, le tampon HEPES 1 M devait également être basifié par 10 µL de NaOH 5 M pour obtenir un pH de la solution de radiomarquage à 3,8. Les résultats en HEPES sont meilleurs que ceux obtenus en tampon acétate. Lors de l'analyse chromatographique, aucun pic de <sup>68</sup>Ga « libre » n'est détecté pour des températures de 95°C et 50°C. Comme précédemment, aucune complexation n'est observée à TA (tab. 27).

Rendement de radiomarquage (%) (n = 1)			
temps	10 min	20 min	30 min
<b>température</b>			
95°C	100	100	100
50°C	100	100	100
TA	-	-	-

**Tableau 27. Résultats des cinétiques de complexation du DOTA en HEPES**

D'après les résultats, les conditions optimales en tampon HEPES sont une température de 50 °C pour un temps d'incubation de 10 min et pour une quantité de DOTA de 115 nmo.

**II.C.2.c Validation des conditions de complexation du <sup>68</sup>Ga avec le DOTA**

Les résultats présentés pour les réactions de complexation du <sup>68</sup>Ga avec le DOTA sont généralement meilleurs que ceux obtenus avec l'HBED. Même si la quantité de chélatant ne reflètent pas les protocoles cliniques (quantité de ligand plus faible que pour nos tests), il a été décidé pour la suite des études de réaliser le radiomarquage avec 115 nmol de DOTA.

La répétition de l'expérience donne une moyenne des rendements de radiomarquage de 97,68 % ± 2,65 % (n = 5). La technique est donc reproductible. Comme pour l'HBED, le rendement obtenu est suffisant pour réaliser les études de stabilité *in vitro* et *in vivo* sans étape de purification. L'AS du complexe a été de 1,74 MBq / nmol.

**Au final, les conditions choisies pour le radiomarquage avec le DOTA sont une quantité de 115 nmol incubé durant 10 min à 95°C dans un tampon acétate de sodium.**

## II.D Études radiochimiques des complexes *in vitro*

### II.D.1 Études radiochimiques dans la solution injectable

#### II.D.1.a Détermination de la lipophilie des complexes

Les complexes possèdent une lipophilie différente de celle calculée pour le chélatant seul. Malheureusement, le calcul du log (P) à partir de la structure du complexe n'a pas été possible avec les logiciels habituellement proposés car ils n'intègrent pas les métaux dans leur base. La détermination de la lipophilie des complexes a été réalisée selon une technique de distribution du produit entre deux phases (octanol / phase aqueuse). Le pH étant l'un des facteurs influençant le caractère lipophile d'un composé, le tampon phosphate 0,1 M à pH 7 (ou PBS pour *phosphate buffer solution*) a été préféré à l'eau pour simuler le pH sanguin.

Les résultats sont présentés dans le tableau 28.

	HBED- <sup>68</sup> Ga (n=3)	DOTA- <sup>68</sup> Ga (n=3)
Log (P)	-1,34	-3
Pourcentage dans le PBS (%)	99,93	100
Pourcentage dans l'octanol (%)	0,07	0

**Tableau 28. Résultats de la détermination de la lipophilie des complexes**

L'interprétation des résultats est limitée. En effet, l'activité ajoutée au mélange octanol – PBS a été dépendante du volume. Un volume trop important de produit aurait interféré avec l'équiproportion nécessaire entre les deux phases pour cette méthode. Il a donc été décidé de conserver un petit volume et de ce fait, une faible activité.

Après dilution de la solution radiomarquée par le NaCl 0,9%, l'activité volumique obtenue était faible à 12,5 MBq / mL. Un volume de 100 µL de la solution de complexe était ajoutée aux volumes d'octanol / PBS soit une activité d'environ 1,25 MBq. Pour cette étude, la détection de l'activité a été réalisée par un activimètre. L'activimètre possédant un seuil de détection élevé, la sensibilité de la mesure était médiocre. Au départ, 3 séparations successives étaient réalisées lors de l'expérience. Dans ce cas, l'activité présente dans la

**Résultats – Études radiochimiques des complexes *in vitro* – Études dans la solution injectable**

phase octanol était rapidement indétectable. De ce fait, il a été décidé que seule la première séparation serait prise en compte.

**Bien que la valeur calculée pour le  $\log(P)$  soit peu significative, les résultats obtenus permettent tout de même de conclure sur le caractère très hydrophile du DOTA et plus faiblement hydrophile de l'HBED.**

**II.D.1.b Études de stabilité**

Pour obtenir une osmolarité acceptable pour une injection IV en bolus, une dilution par du NaCl 0,9 % basifié est nécessaire. Afin de vérifier que la dilution et l'augmentation du pH de la solution ne modifiaient pas la stabilité du complexe, des analyses chromatographiques par CLHP ont été réalisées. Les solutions laissées à TA ont été analysées aux temps 0 min, 120 min et 180 min afin de déterminer une possible décomplexation du  $^{68}\text{Ga}$  ou une dégradation du complexe.

Les résultats de la pureté radiochimique des deux solutions de complexes sont présentés dans le tableau 29.

	Pureté radiochimique (%)	
	HBED- $^{68}\text{Ga}$ (n = 3)	DOTA- $^{68}\text{Ga}$ (n = 3)
<b>rendement de marquage</b>	94,8 ± 1,3	96,6 ± 2,6
<b>0 min</b>	98,6 ± 1,8	98,2 ± 1,6
<b>120 min</b>	98,9 ± 1,5	> 99,9
<b>180 min</b>	98,2 ± 2,5	> 99,9

**Tableau 29. Résultats de la stabilité des complexes en solution injectable**

Les résultats montrent que les complexes sont stables en solution diluée et à pH 6,5 - 7. Les solutions peuvent donc être conservées à TA durant 3 h. Il est intéressant de noter que la pureté radiochimique des complexes au temps initial est supérieure aux rendements de radiomarquage. Cette constatation est certainement liée à l'approche expérimentale car en pratique la solution de marquage était laissée à incuber durant le premier contrôle par CLHP. Durant cette période allant de 6 à 8 min (injection du produit et élution du premier pic de

**Résultats – Études radiochimiques des complexes *in vitro* – Études dans le sang de souris**

radioactivité), la réaction de complexation continuait, augmentant encore le rendement de radiomarquage.

## **II.D.2 Études radiochimiques dans le sang de souris**

Les coefficients de stabilités et les  $p\text{Ga}$  des complexes caractérisent la stabilité et l'affinité des chélatants pour le  $^{68}\text{Ga}$ . Cependant, ces grandeurs ont été fixées dans des conditions éloignées du pH sanguin et de la température sanguine. De plus, les solvants utilisés pour leur détermination ne reflètent pas le pouvoir décomplexant du sang. Le sang est un milieu où des ions métalliques et de biomolécules peuvent interagir facilement avec le  $\text{Ga}^{3+}$ . La présence d'enzymes peut également être à l'origine de la dégradation du complexe radiomarqué.

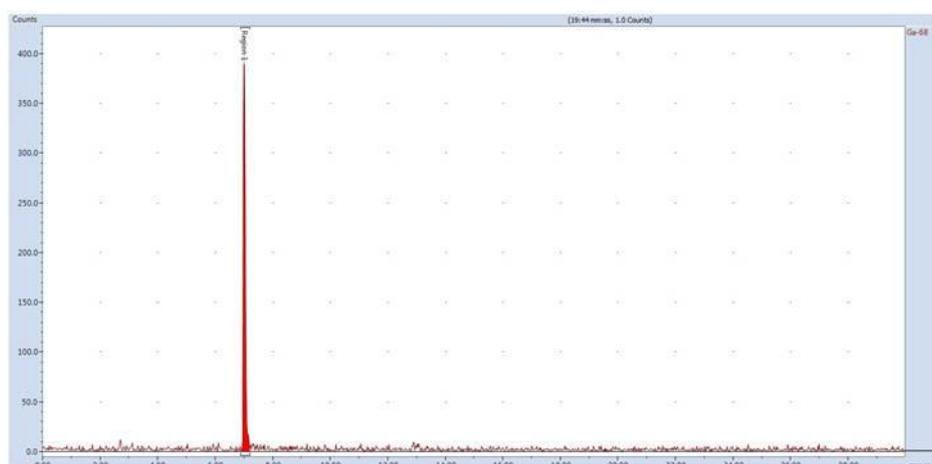
D'autre part, les traceurs se distribuent dans l'organisme à partir de la circulation sanguine. La distribution tissulaire est due à la différence d'affinité entre les protéines plasmatiques et les cibles cellulaires. Plus la fixation aux protéines plasmatiques est forte, moins le traceur peut diffuser dans les tissus car seule la forme libre est diffusible.

Les études suivantes évaluent donc le comportement des complexes dans le sang ainsi que l'apport du chélatant complexé dans la biodisponibilité du futur traceur.

### **II.D.2.a Études du complexes HBED- $^{68}\text{Ga}$**

Deux techniques pour étudier la liaison du complexe aux protéines plasmatiques ont été utilisées. La première était réalisée par une acidification du plasma avec du TCA 50 %. La précipitation des protéines suivie d'une centrifugation permettait la séparation du culot protéique et du complexe non lié. Cependant, lors de l'analyse chromatographique, le complexe n'apparaissait plus et un autre produit à un temps de  $T_r = 7,0$  min était présent (fig. 58)

**Résultats – Études radiochimiques des complexes *in vitro* – Études dans le sang de souris**



**Figure 58. Illustration du composé complexé au  $^{68}\text{Ga}$  lors de l'ajout de TCA.**

Plusieurs hypothèses ont été examinées pour comprendre ce phénomène.

La présence d'héparine pour empêcher la coagulation du sang a tout d'abord été mise en cause. Cependant, l'ajout d'héparine dans la solution injectable n'a pas modifié le complexe.

La deuxième hypothèse était que l'ajout d'acide trichloroacétique entraînait la modification observée. Celle-ci a été confirmée par une analyse chromatographique.

Une autre technique de séparation des protéines et du complexe a donc été proposée : une séparation par filtration. Le temps de centrifugation a été adapté pour que la totalité du volume de la solution soit filtrée. L'ensemble des résultats aux différents temps d'analyse est présenté dans le tableau 30.

	0 min	30 min	60 min	120 min	180 min
<b>Liaison aux cellules (%) (n=2)</b>	11,1 ± 4,38	15,8 ± 12,3	14,0 ± 4,13	20,2 ± 2,12	29,2 ± 5,23
<b>Liaison aux protéines (%) (n=3)</b>	30,5 ± 7,64	32,3 ± 6,20	34,2 ± 1,08	34,8 ± 4,72	40,7 ± 6,41
<b>Pureté radiochimique (%) (n=3)</b>	96,2 ± 1,02	96,9 ± 2,61	95,6 ± 4,82	96,3 ± 4,89	94,9 ± 6,75

**Tableau 30. Résultats des études *in vitro* du complexe HBED- $^{68}\text{Ga}$  dans le sang**

**Résultats – Études radiochimiques des complexes *in vitro* – Études dans le sang de souris**

Le complexe est faiblement lié aux cellules sanguines. Il est plus fortement lié aux protéines plasmatiques. Ces résultats sont cohérents par rapport au caractère moyennement hydrophile du complexe. De plus, le complexe n'est pas dégradé dans le sang. Les moyennes de puretés radiochimiques entre les temps 0 min et 180 min ne présentent aucune différence significative ( $p = 0,5$ ).

**Les résultats montrent que le complexe HBED est stable dans le sang de souris. Il est peu lié aux cellules sanguines et plus fortement lié aux protéines plasmatiques.**

**II.D.2.b Études du complexe DOTA- $^{68}\text{Ga}$**

L'étude de la liaison du complexe DOTA- $^{68}\text{Ga}$  aux protéines a été également évaluée avec les deux techniques de séparation des protéines.

L'ajout de TCA ne semblait pas modifier le produit.

Cependant, les temps de rétention étant courts lors des analyses CLHP, la présence d'un produit complexé avec le  $^{68}\text{Ga}$  mais n'étant pas le complexe DOTA- $^{68}\text{Ga}$  ne pouvait pas être exclu. Une autre hypothèse pour ces résultats serait que la grande inertie cinétique du complexe DOTA- $^{68}\text{Ga}$  limite l'action du TCA sur le complexe.

Finalement, dans le but de pouvoir comparer les deux complexes, la technique de filtration a tout de même été préférée.

Les résultats sont présentés dans le tableau 31.

	0 min	30 min	60 min	120 min	180 min
<b>Liaison aux cellules (%) (n=3)</b>	28,6 ± 15,62	22,1 ± 11,04	21,2 ± 10,59	17,6 ± 10,68	18,9 ± 13,91
<b>Liaison aux protéines (%) (n=3)</b>	21,4 ± 2,98	21,0 ± 13,08	25,3 ± 17,40	16,27 ± 2,83	18,6 ± 1,21
<b>Pureté radiochimique (%) (n=3)</b>	> 99,99	> 99,99	> 99,99	> 99,99	> 99,99

**Tableau 31. Résultats des études *in vitro* du complexe DOTA- $^{68}\text{Ga}$  dans le sang**

### Résultats – Études radiochimiques des complexes *in vitro* – Études dans le sang de souris

Comme pour le complexe HBED- $^{68}\text{Ga}$ , le complexe DOTA- $^{68}\text{Ga}$  est faiblement lié aux cellules sanguines. Il est également faiblement lié aux protéines plasmatiques. Sa pureté radiochimique est très élevée.

**Le complexe DOTA- $^{68}\text{Ga}$  n'est donc pas dégradé dans le sang, il est faiblement lié aux cellules sanguines et aux protéines plasmatiques.**

## II.E Études de biodistributions *in vivo*

Les résultats des études radiochimiques *in vitro* étant satisfaisants, des biodistributions chez la souris ont donc pu être menées.

Les complexes ont été injectés chez des souris femelles CD-1 pour évaluer leur distribution dans l'organisme. Les souris ont été séparées en deux groupes de 3 individus et les biodistributions ont été réalisées à 10 min et 60 min post injection (résultats présentés en annexe 3, fig. 59 et 60).

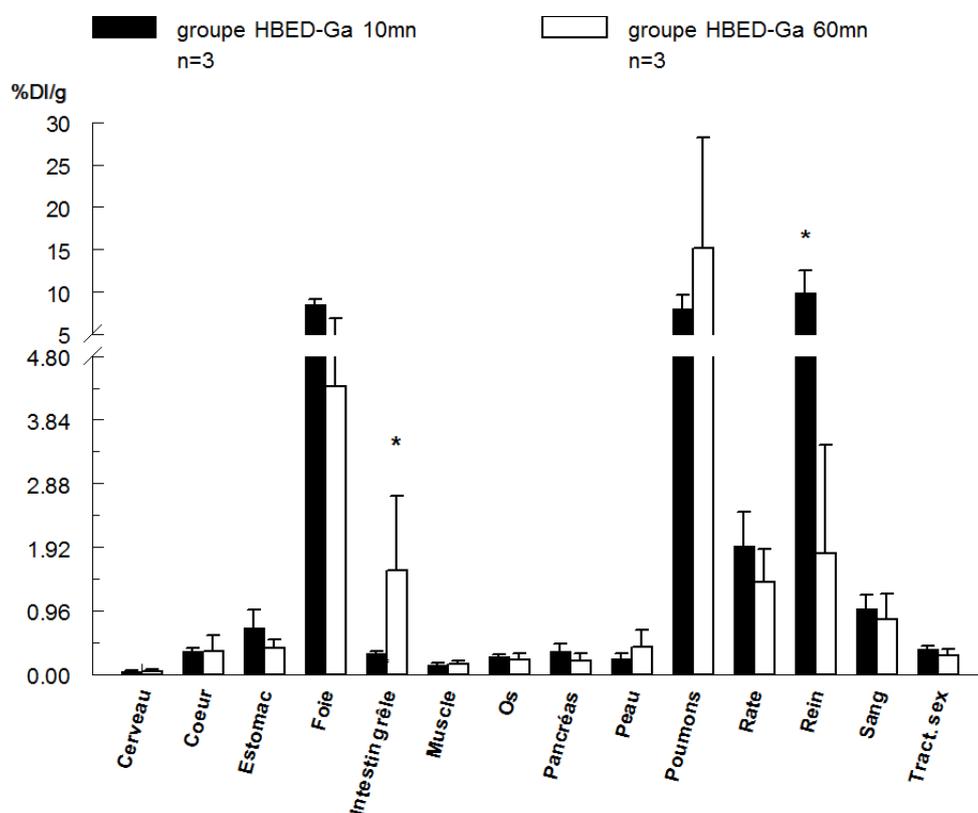


Figure 59. Comparaison des biodistributions pour le HBED- $^{68}\text{Ga}$  à 10 min et 60 min

Résultats – Études radiochimiques des complexes *in vivo*

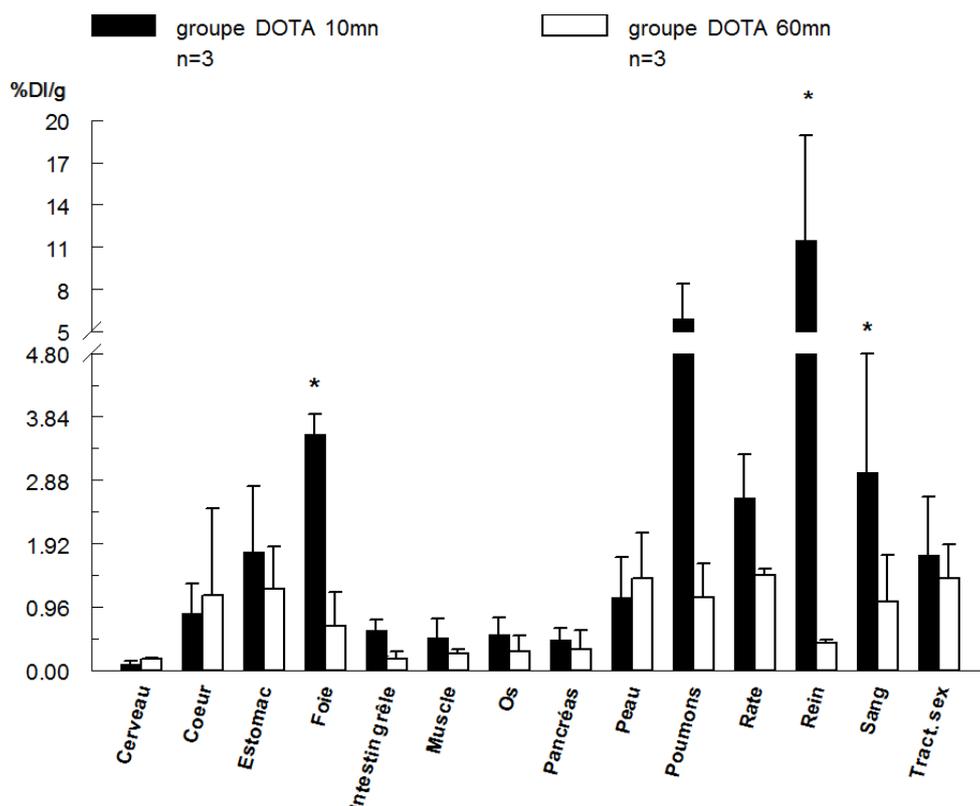


Figure 60. Comparaison des biodistributions pour le DOTA- $^{68}\text{Ga}$  à 10 min et 60 min

Les résultats montrent que l'HBED- $^{68}\text{Ga}$  est excrété de façon mixte entre le foie et le rein.

Le DOTA- $^{68}\text{Ga}$  est majoritairement excrété par le rein. A 10 min, la différence de captation (exprimée en pourcentages de la dose injectée rapportée au poids de l'organe) entre le rein et le foie est significative ( $p = 0,049$ ,  $n = 3$ ).

Les captations sont significativement différentes entre 10 min et 60 min pour le foie, le rein et le sang pour le DOTA- $^{68}\text{Ga}$  et pour l'intestin et le rein pour l'HBED- $^{68}\text{Ga}$  ( $p = 0,049$ ,  $n = 3$ ).

Une comparaison des captations entre les deux complexes à 10 min et 60 min présentent également certaines différences significatives.

A 10 min, la fixation du DOTA- $^{68}\text{Ga}$  est supérieure à celle de l'HBED- $^{68}\text{Ga}$  pour le cerveau, le cœur, le muscle, l'os, la peau, le sang et le tractus sexuel. Inversement, elle est plus élevée pour le complexe HBED- $^{68}\text{Ga}$  pour le foie et l'intestin ( $p = 0,049$ ,  $n = 3$ ).

A 60 min, la fixation du DOTA- $^{68}\text{Ga}$  reste supérieure dans le cerveau ( $p = 0,049$ ,  $n = 3$ ). Dans le poumon, l'HBED- $^{68}\text{Ga}$  s'accumule de façon significative ( $p = 0,049$ ,  $n = 3$ ).

Partie expérimentale – Études radiochimiques des complexes du  $^{68}\text{Ga}$

### **Résultats – Études radiochimiques des complexes *in vivo***

Cependant, toutes ces différences restent faiblement significatives. En effet, le nombre d'individus par groupe est faible ce qui limite la portée de l'analyse statistique.

**Les études *in vivo* ont permis de mettre en évidence certaines différences de biodistribution entre les deux complexes. Ces résultats devront être confirmés par l'augmentation du nombre d'animaux par groupe**

### **III Discussion**

#### **Caractérisation du générateur**

Le générateur d'Obninsk est le générateur historique depuis la commercialisation des générateurs de  $^{68}\text{Ge} / ^{68}\text{Ga}$ . A ce titre, les spécifications de ce générateur ne sont plus en accord avec celles édictées par la monographie de l'éluat notamment pour le pourcentage de  $^{68}\text{Ge}$  dans l'éluat de  $^{68}\text{Ga}$  (0,005% vs 0,001% pour la monographie). Ce générateur peut uniquement être utilisé dans des applications précliniques. La chute importante de l'activité éluee au cours du temps est également un argument en sa défaveur. Celle-ci est bien supérieure aux activités minimales annoncées par le fabricant malgré le respect des protocoles d'élution.

Cette perte d'activité a déjà été décrite par Asti et al (195). En effet, les auteurs montrent qu'après 100 éluations l'activité éluee ne représente plus que 69 % de l'activité calculée. Ces observations sont cohérentes avec nos résultats.

Cette diminution pourrait être liée soit à la fuite de  $^{68}\text{Ge}$  durant l'élution, soit à l'instabilité de la colonne entraînant une augmentation de la rétention de  $^{68}\text{Ga}$ .

Dans notre travail, les comparaisons entre les rendements d'élution mesurés et théoriques ne présentent pas de différences au cours du temps. De ce fait, il est peu probable qu'une rétention accrue de  $^{68}\text{Ga}$  soit la cause de la perte d'activité.

D'autre part, bien que l'étude de la fuite de  $^{68}\text{Ge}$  n'ait pas été clairement étudiée, les pourcentages de  $^{68}\text{Ge}$  mesurés dans les éluats issus d'autres générateurs produits également par le cyclotron d'Obninsk ne suggèrent pas non plus que la diminution de l'activité soit liée à une fuite de  $^{68}\text{Ge}$  dans l'éluat.

Ces études permettent de conclure que l'hypothèse la plus probable est que la durée de vie de ce générateur ne soit pas celle spécifiée par le fournisseur.

#### **Études sur les méthodes de purification de l'éluat**

Concernant les méthodes de purification de l'éluat, le choix de la méthode par échange cationique a été déterminée par son accessibilité au regard des pratiques professionnelles actuelles. En effet, aucun traitement préalable de l'éluat n'était nécessaire avant son étape de purification.

## Discussion

La technique de purification par échange anionique nécessitait une acidification importante du pH de l'éluat. Outre la difficulté technique qu'elle engendrait, une perte non négligeable de l'activité était à prévoir lors du transfert de l'éluat du flacon d'acidification vers la colonne. Enfin, cette technique augmentait le temps nécessaire à la purification et potentiellement la dosimétrie de l'opérateur.

Lors de la purification par l'acétone (méthode de Ocak), les variations des rendements de purification pour la colonne non pré-conditionnée ont été résolues par le lavage de celle-ci par de l'HCl 5 M. Les fonctions d'échange étaient ainsi régénérées de façon homogène quelque soit le traitement subi au préalable par la colonne.

Cette étape réalisée préalablement à la manipulation ajoutait une durée supplémentaire. La durée de préparation de l'expérience était d'environ 60 min pour une manipulation comprise entre 30 min et 40 min. La préparation comprenait la réalisation extemporanée des solvants et de la solution de radiomarquage, le pré-conditionnement de la colonne et la mise en place du circuit dans l'enceinte qui devait être remontée quotidiennement.

Pour réduire ce temps notamment dans la perspective d'une phase clinique, l'utilisation d'un automate de synthèse à cassette serait une alternative intéressante. En effet, ces cassettes sont pré-conditionnées et doivent simplement être adaptées sur l'automate. Malheureusement, ces systèmes sont difficilement utilisables en recherche car bien que certains paramètres comme le temps d'incubation ou les temps de transfert soient modulables, les composants sont intégrés à la cassette et ne peuvent donc pas être modifiés. Actuellement, seuls les analogues de la somatostatine bénéficient de ce type de cassettes.

Les automates de recherche qui sont une autre alternative ne réduisent pas les temps de préparation qui restent très élevés de l'ordre de 30 à 60 min. Cependant, ils permettent une grande reproductibilité de la technique de marquage et réduisent la dosimétrie de l'opérateur.

Le système semi-automatisé présenté dans ce travail est opérateur dépendant. Son principal avantage est qu'il réduit la dosimétrie de l'opérateur grâce au système de tubulures. Cependant, ce système n'est pas transposable en clinique ou dans des études précliniques nécessitant des générateurs possédant une forte activité.

De ce fait, l'activité du générateur était l'un des facteurs limitant de notre étude.

## Discussion

Dans ce contexte, la méthode de Ocak n'a pas donné des résultats satisfaisants. La limite majeure de cette méthode était l'activité volumique. En effet, le volume des éluats purifiés restait élevé de l'ordre de 800  $\mu\text{L}$ .

L'étape d'évaporation augmentait le temps de manipulation de 10 min ce qui réduisait encore la radioactivité du produit fini et donc le nombre d'injections *in vivo*. Cependant, elle reste aujourd'hui la méthode choisie en clinique pour le radiomarquage des analogues de la somatostatine. En effet, elle fut la première décrite et donne des résultats de rendements de l'étape de pré-purification reproductibles.

La comparaison des deux techniques de purification cationique montre que les rendements d'élutions de la méthode de Ocak étaient significativement plus faibles que ceux obtenus avec la méthode de Mueller ( $p < 0,001$ ).

La méthode de Mueller réunissait de nombreux avantages : un solvant d'élution compatible avec la réaction de complexation, une diminution du temps total de l'expérience et un volume d'élution faible induisant une augmentation de l'activité volumique.

La difficulté de cette méthode a été l'osmolarité de la solution injectable. La faible activité du générateur ne permettait pas de diluer le produit fini tout en conservant une activité volumique acceptable.

Une purification finale avec un changement de solvant a été envisagée mais les chélatants sont des molécules de faibles poids moléculaires qui ne possèdent pas d'affinité particulière pour les cartouches de purifications C-18. La perte lors de l'étape de purification était trop importante et l'activité restante était alors insuffisante pour des études *in vivo*.

La solution a donc été d'optimiser la méthode de purification en réduisant au maximum la concentration en ions  $\text{Na}^+$ .

Les études menées ont permis d'obtenir une solution ayant une osmolarité acceptable pour une injection IV en bolus tout en conservant une activité volumique correcte. Si l'activité manipulée pouvait être supérieure à 1 GBq, la technique décrite par Mueller aurait été préférée à notre optimisation car celle-ci donne des résultats de rendements d'élution significativement plus élevés ( $p < 0,0027$ ).

Afin de confirmer la supériorité de la technique de Mueller par rapport aux autres techniques de purification, une étude de comparaison des concentrations de métaux dans

## **Discussion**

l'éluat de  $^{68}\text{Ga}$  purifié a été réalisée. Les résultats de dosage sont extrêmement variables et ne permettent pas de comparer de façon satisfaisante les méthodes entre elles.

Une hypothèse pour la forte variabilité des résultats serait la présence de métaux contaminants dans le flacon d'éluion, adsorbés au verre. Cependant, même après un traitement du verre, les concentrations en métaux contaminants varient pour une même technique. Le choix d'un récipient adapté à ce type de dosage et la production d'un blanc par le solvant d'éluion réalisé dans les mêmes conditions que la purification paraissent donc indispensables.

En conclusion sur la comparaison des techniques de purification, la méthode de purification par échange cationique avec le solvant NaCl (Mueller) donne des résultats supérieurs à la même technique de purification utilisant un mélange acétone / HCl (Ocak). La méthode de Mueller a donc été retenue pour la suite des travaux

## **Études de radiomarquage des complexes**

Après avoir obtenu des caractéristiques d'éluat compatibles avec le radiomarquage et dans le but d'une future injection chez la souris, plusieurs conditions de radiomarquage ont été testés pour le DOTA et l'HBED.

Les études ont été menées dans les deux tampons de réaction les plus couramment cités dans la littérature : l'acétate de sodium et l'HEPES.

L'HEPES est un tampon dont les caractéristiques de toxicité ne sont pas clairement établies. Il est cependant utilisé en clinique dans le cadre d'essais avec des vecteurs conjugués à l'HBED et radiomarqués au  $^{68}\text{Ga}$  (264). Dans cette étude, le tampon de marquage est éliminé lors de la purification finale du traceur. La préférence des auteurs pour l'HEPES est essentiellement liée aux excellents rendements de radiomarquage obtenus avec ce tampon et à l'augmentation de l'AS du produit radiomarqué.

L'HEPES peut également être utilisé pour le radiomarquage de l'édotréotide (analogue de la somatostatine) (298). La monographie précise dans ce cas que « la solution injectable de gallium ( $^{68}\text{Ga}$ ) édotréotide est préparée par des méthodes destinées à éviter ou éliminer l'acide 4-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-1-éthanesulfonique (HEPES) dans la préparation finale ». Dans notre étude, le tampon HEPES n'est pas dilué durant l'étape de radiomarquage.

## Discussion

Afin de se conformer aux pratiques réglementaires, le tampon acétate a été préféré au tampon HEPES car aucune élimination n'était réalisable lors de la synthèse.

Les essais de radiomarquage avec l'acétate montrent que très peu de colloïdes sont formés à pH 3,8. Ces résultats sont cohérents avec ceux présentés par les équipes de Morfin et de Personn sur l'action protectrice des acétates ou des citrates (299,300). Ils forment des complexes ayant une faible constante d'équilibre ( $\log(\beta) = 1$  à pH 4,49). Lors du radiomarquage, des intermédiaires sont formés avec les CBF et limitent l'hydrolyse des ions  $\text{Ga}^{3+}$ .

L'essai d'élution des colonnes cationiques avec le tampon citrate montrait un rendement très important de 98 %. Cependant dans le cas d'un excès important de citrates dans la solution, les complexes citrate- $^{68}\text{Ga}$  présentent une stabilité élevée avec un  $\log(\beta) = 15$  pour un pH de 4,03. Cela confirme que l'utilisation d'une solution concentrée de citrate pour l'élution de la colonne cationique ou pour le radiomarquage semble moins pertinente que le tampon acétate dont la constante reste très faible.

Dans notre étude, les AS calculées pour les deux chélatants sont faibles en comparaison des données issues de la littérature (50 MBq / nmol). Plusieurs explications sont possibles.

La première est que la technique de synthèse n'est pas optimale. Le flacon d'élution dans lequel est réalisée la réaction de marquage à une contenance de 10 mL pour un volume de la réaction de 650  $\mu\text{L}$ . Un récipient de plus petite taille serait donc plus adapté au volume. De même, un traitement par l'acide du flacon éliminerait la forte concentration en métaux mis en évidence lors des études de contamination.

Une autre explication est la faible activité de notre générateur. En effet, dans la littérature, les AS sont calculées pour des activités de 1 GBq ce qui n'est pas le cas dans notre étude.

En extrapolant à une activité de 1 GBq, l'AS pour le complexe HBED- $^{68}\text{Ga}$  serait de 43 MBq / nmol et correspondrait à celles décrites dans la littérature.

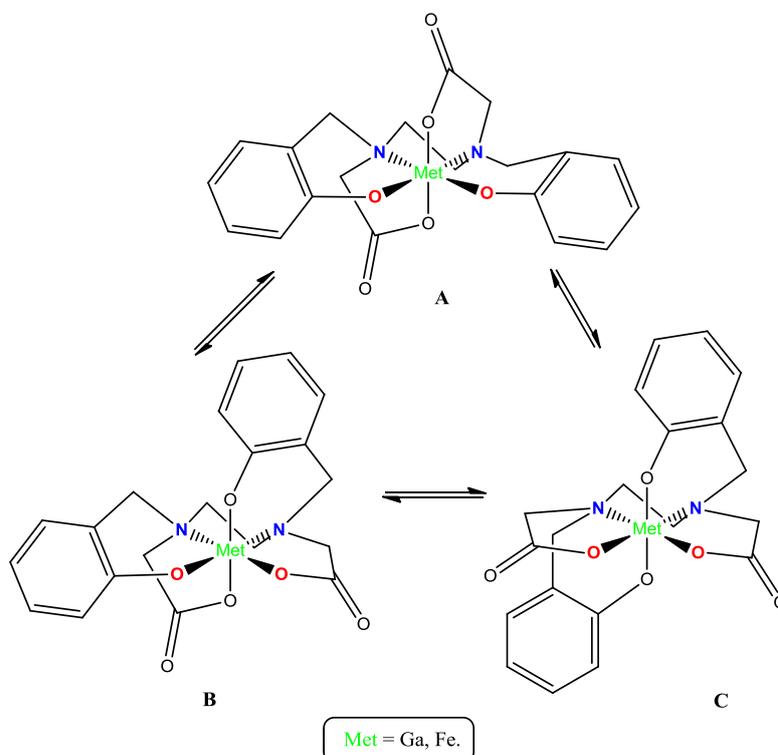
Pour le DOTA, celle-ci resterait plus faible à 8,69 MBq / nmol. L'explication avancée pour la faible AS du complexe DOTA- $^{68}\text{Ga}$  pourrait être la forte contamination métallique dans notre mélange réactionnel. Le DOTA possédant un  $p\text{Ga}$  inférieur à celui de l'HBED, il est

**Discussion**

probable que l'influence des contaminants notamment du Fe soit plus forte pour ce chélatant.

Les résultats obtenus pour les cinétiques du DOTA à 50°C sont étonnantes. Ces résultats sont cependant à nuancer. La quantité de DOTA est largement supérieure à celles des études menées avec des dérivés conjugués à des peptides ou des haptènes. Il est probable que l'impact de la diminution de la température à 50°C aurait été plus important pour des concentrations plus faibles en chélatant. De plus, le DOTA est ici sous sa forme non fonctionnalisée. Aucune étude sur la complexation du DOTA non fonctionnalisé par le  $^{68}\text{Ga}$  n'a été publiée jusqu'à ce jour. Il n'est pas assimilable aux dérivés fonctionnalisés utilisés dans les études précliniques ou cliniques. Il est probable que l'utilisation du C-DOTA ou du DO3A ne donne pas les résultats équivalents lors d'essais de radiomarquage dans des conditions similaires. Les résultats obtenus sont donc difficilement comparables à ceux de la littérature.

Pour l'HBED, 4 pics sont présents lors des analyses CLHP. Il est probable que les 3 pics à des  $T_r$  proches de 12,5 min soient en réalité des stéréoisomères du complexe. En effet, trois arrangements spatiaux des donneurs sont possibles (fig. 61).



**Figure 61. Représentations spatiales des isomères du complexe de l'HBED**

## Discussion

Cette hypothèse est corroborée par les travaux de Krokhin et al. et de Lucena et al qui ont étudié le complexe HBED-Fe en électrophorèse capillaire et CLHP respectivement (297,301).

Ces travaux montrent que le complexe ferrique de l'HBED analysé par CLHP conduit à l'observation de 2 pics. Leurs proportions relatives semblent indiquer la stabilité relative des stéréoisomères dans les conditions d'analyse et de formation du complexe.

Du fait des similitudes entre le Fe et le Ga, ces résultats sont en accord avec nos analyses. Dans notre cas, il est vraisemblable que les 3 stéréoisomères soient visualisables par CLHP. Pour un métal labile comme le Ga, ceux-ci sont interconvertibles. Le pic le plus intense à  $T_r = 12,5$  min doit également correspondre au stéréoisomère le plus stable. Dans le cas du complexe HBED-Fe, il s'agit du stéréoisomère noté A obtenu à l'état cristallin et caractérisé par l'étude de la diffraction aux rayons X (fig. 61 A.).

Pour le quatrième pic à  $T_r = 12,1$  min, plusieurs hypothèses sont possibles. La première est qu'il s'agirait d'une impureté ayant complexé le  $^{68}\text{Ga}$ . Cependant, les analyses RMN n'ont pas permis de la détecter. Elle est donc nécessairement présente en faible quantité puisque le seuil de détection de l'appareil est à 5 %. Or, la forte variation du pourcentage de radioactivité observée entre les deux tampons rend cette hypothèse peu réaliste. En effet, une source de contamination de 5 % dans l'HBED ne pourrait pas faire varier le pourcentage du pic de radioactivité de 3,3 % à 25,6 %.

Il est donc probable qu'il s'agisse d'un intermédiaire de complexation de l'HBED- $^{68}\text{Ga}$  soit possédant un état de protonation incomplet, soit incorporant un ligand exogène exerçant une influence sur la séparation en CLHP.

En conclusion, les études de radiomarquages ont probablement permis de mettre en évidence les 3 stéréoisomères de l'HBED- $^{68}\text{Ga}$  qui n'avaient pas été isolés jusque là. Les études avec le DOTA confirment que la présence de métaux influe sur le rendement de radiomarquage de ce chélatant et de façon beaucoup plus importante que pour l'HBED. De ce fait, dans le but de proposer une fonctionnalisation de l'haptène, l'HBED paraît être le chélatant le plus adapté.

## Discussion

### Études radiochimiques *in vitro*

Leur caractère hydrophile des complexes a été déterminé par un calcul du log (P). Dans notre travail, cette détermination du log (P) est discutable.

En effet, pour réaliser cette étude, un spectromètre gamma aurait été plus adapté au vu des petites activités utilisées. Cependant, les faibles activités retrouvées dans la phase octanol permettent de confirmer que les deux complexes sont hydrophiles.

Les études de radiochimie ont permis de confirmer que les complexes ne sont pas dégradés dans la solution injectable ainsi que dans le sang de souris. Une différence significative entre les deux complexes est cependant trouvée avec une plus forte liaison aux protéines pour l'HBED ( $p = 0,005$ ). Cette différence peut s'expliquer par la très forte hydrophilie du complexe DOTA- $^{68}\text{Ga}$  et la plus faible hydrophilie du complexe HBED- $^{68}\text{Ga}$  qui comporte deux noyaux aromatiques.

La présence d'une grande quantité de  $^{68}\text{Ga}$  non complexé modifie de façon très importante le pourcentage de liaisons aux cellules sanguines.

En effet, un essai de stabilité dans le sérum avec une solution ayant un rendement de marquage de 3 % montre que plus de 93 % de l'activité est retrouvée dans le culot cellulaire. Ce résultat s'explique par le fait que durant l'étape de centrifugation, les colloïdes de  $^{68}\text{Ga}$  se retrouvent également dans le culot. Purifié des cellules et des protéines, le filtrat analysé par chromatographie représente uniquement le produit complexé. L'analyse CLHP évalue donc dans notre technique la pureté radiochimique du composé mais elle ne permet pas de conclure sur le niveau de décomplexation du  $^{68}\text{Ga}$ . Les activités retrouvées dans le culot sont donc en majorité les colloïdes et représentent la démétallation du complexe. A partir des données des études de liaisons aux cellules, il est donc possible d'en conclure que le complexe HBED- $^{68}\text{Ga}$  est stable à  $70,8 \% \pm 5,23 \%$  en moyenne à 180 min et que le complexe DOTA- $^{68}\text{Ga}$  est stable à  $81,07 \% \pm 10,71 \%$  en moyenne. La différence entre ces deux moyennes n'est pas significative ( $p = 0,56$ ).

Les complexes sont donc stables durant 3h dans la solution injectable comme dans le sang de souris. Leur pureté radiochimique est très élevée et permet de conclure sur le fait que les complexes ne sont pas dégradés dans le sang.

## Discussion

### Études *in vivo* de biodistribution chez la souris

Concernant le comportement des chélatants *in vivo*, leurs biodistributions sont similaires. Cependant, des différences significatives se dégagent.

Notamment à 10 min, de nombreux organes accumulent le DOTA- $^{68}\text{Ga}$  ce qui n'est pas le cas pour l'HBED- $^{68}\text{Ga}$ . Cependant, une analyse détaillée des résultats montre qu'une souris du groupe DOTA- $^{68}\text{Ga}$  possède une distribution sanguine très supérieure aux 2 autres. La significativité dépend de cet individu et peut expliquer l'accumulation observée pour ces organes qui sont fortement irrigués (cerveau cœur, muscle, os, peau, tractus sexuel).

A 60 min, la différence significative dans les poumons en faveur de l'HBED- $^{68}\text{Ga}$  est également liée à un seul individu du groupe. La faible accumulation dans la rate n'est pas en faveur d'une décomplexation du  $^{68}\text{Ga}$ . Par contre, l'analyse du groupe montre que pour cet individu, le pourcentage d'HBED- $^{68}\text{Ga}$  circulant est très supérieur. Cette observation est en faveur d'une plus forte fixation aux protéines plasmatiques du complexe pour cet individu et pourrait expliquer les accumulations pulmonaire et hépatique.

L'élimination mixte du complexe HBED- $^{68}\text{Ga}$  peut expliquer la différence significative observée à 10 min pour l'intestin et le foie. Il est également en faveur d'une plus faible hydrophilie de ce complexe par rapport au DOTA- $^{68}\text{Ga}$ .

Les résultats sont cependant à nuancer. Le faible effectif par groupe et la forte variation intra-groupe doit limiter l'interprétation des analyses. Bien que des différences significatives aient été trouvées, il est préférable d'assimiler ces résultats à des tendances. Seul une augmentation des effectifs d'animaux permettra de réaliser des études statistiquement interprétables.

Les tendances retrouvées pour les biodistributions sont en faveur d'une plus faible hydrophilie de l'HBED- $^{68}\text{Ga}$  par rapport au DOTA- $^{68}\text{Ga}$ . Ce résultat peut avoir un intérêt si l'HBED est fonctionnalisé sur une molécule ayant une excrétion rénale majoritaire comme c'est le cas pour les haptènes.

L'ensemble de ces études a été impacté par les problèmes techniques rencontrés notamment la faible activité éluee du générateur et l'utilisation d'un procédé manuel pour le radiomarquage. L'utilisation de flacons non traités est également une limite importante. Lors

### **Discussion**

de la validation du radiomarquage de l'haptène fonctionnalisé avec l'HBED, il sera impératif que les flacons soient lavés à l'HCl concentré pour éliminer les contaminants métalliques présents sur le verre et que celui-ci soit réalisé avec un automate de synthèse.

En conclusion de cette seconde partie, les études de radiochimie des complexes montrent que l'HBED comme le DOTA sont des chélatants intéressants pour le radiomarquage du  $^{68}\text{Ga}$ . Il apparaît cependant que l'HBED donne une meilleure AS que le DOTA et sera donc préféré pour de futures études avec le système AcBs / haptène di-HSGL.

# DISCUSSION GÉNÉRALE

---

Les travaux menés durant ce doctorat ont permis la production d'un vecteur divalent pour l'imagerie par préciblage dans les tumeurs solides. Cet AcBs, bien que déjà validé *in vivo*, a été caractérisé avec la forme monovalente du nouvel haptène di-HSGL. L'affinité du versant 679 pour ce monomère a été mesurée pour la première fois durant notre étude. Il donne des résultats satisfaisants et proches des résultats précédemment cités pour des haptènes de structure similaire. Les immunoréactivités sont cependant décevantes. Une altération des paratopes des AcBs est possible et devra être confirmée. Dans le cas où il s'agirait d'une altération des sites lors de la synthèse de l'AcBs, des études sur la fixation du PDM et du NEM devront être réalisées. Celles-ci pourraient être étudiées par spectrométrie de masse en utilisant une technique de marquage isotopique (302). Après la synthèse de l'AcBs et une réduction par le  $\beta$ -mercaptoéthanol ou le DTT dans les conditions d'électrophorèse, la présence de ces molécules sur les chaînes L serait en faveur d'une altération de la reconnaissance de l'AcBs pour son haptène.

Concernant les études de radiochimie avec le  $^{68}\text{Ga}$ , l'HBED est plus adapté que le DOTA pour un radiomarquage de l'haptène. Sa fonctionnalisation pour former un agent bifonctionnel est relativement aisée et ne devrait pas entraîner de modifications majeures des conditions de radiomarquage puisqu'elle ne touche pas la partie chélatante (C-fonctionnalisation du pont éthylénique).

Le marquage de l'HBED avec le  $^{68}\text{Ga}$  n'avait jamais été validé avec l'acétate de sodium pour des quantités aussi faibles de chélatants. Une étude antérieure datant de 2001 et proposant un AcBs anti MUC-1 X anti-HBED-CC avait été évaluée chez l'homme (172). Cependant, dans cette étude la quantité d'HBED était de 40 nmol. La technique de radiomarquage utilisait une évaporation complète de l'éluat avant sa reprise dans de l'acétate 0,1 M. Cette technique est depuis abandonnée au profit de la méthode décrite par Mueller. Les premiers résultats de radiomarquage sont encourageants et rentrent dans le cadre de la réglementation européenne (préférence de l'acétate à l'HEPES). La température retenue est compatible avec le peptide dont l'analogue IMP-241 (conjugué au DOTA) a déjà été validé dans les mêmes conditions.

## Discussion générale

Le troisième objectif de ce travail n'a pas pu être réalisé. En effet, la synthèse de l'haptène di-HSGL a posé de nombreuses difficultés, retardant son obtention et rendant impossible son utilisation.

Le système de préciblage, basé sur un couple anticorps – haptène, nécessite d'étudier différents paramètres pharmacocinétiques dont 3 soit considérés comme essentiels : la dose molaire d'anticorps injectée, le ratio anticorps / haptènes et l'intervalle entre les injections. Les études précédentes réalisées par l'équipe montraient qu'une quantité importante d'AcBs de l'ordre du mg était nécessaire pour saturer l'ACE. Pour la lignée LS174T, celle-ci a été estimée à 5 nmol (500 µg) (303). De même, une étude sur la saturation d'un AcBs F6 x 734 par l'haptène di-DTPA-In a déterminé que la saturation de l'AcBs était maximale pour une quantité d'haptène de 0,5 nmol soit un ratio de 10 / 1 (292). Plus récemment, E. Frampas a montré que ce ratio était optimal dans le système TF2 / IMP-288 (304). Bien que le vecteur soit différent, le versant anti-haptène est issu de l'Acm 679 et sa valence est identique à celle de l'AcBs F6 X 679. Il est donc probable que le ratio entre l'anticorps et l'haptène soit identique. Enfin, les études de préciblage avec l'AcBs F6 X 679 présentés en 2001 par l'équipe montrent que l'intervalle de temps entre les injections doit être de 48 h pour que le rapport tumeur / sang soit le plus élevé à 16 (305). A 24h post injection de l'AcBs, le pourcentage d'activité dans le sang est encore élevé à 1,32 % DI / g. La quantité d'AcBs circulant à 24 h a été confirmée par Griffith et al. dans une étude utilisant un AcBs hMN14 X 679 dérivé de l'AcBs F6 X 679 et l'haptène IMP-241 radiomarqué au <sup>67</sup>Ga (284). Dans cette étude, le pourcentage de la dose injectée dans le sang reste élevée à 1,5 % DI /g pour un intervalle de 24 h entre l'AcBs et l'haptène. Le rapport tumeur / sang est plus faible à R = 2.

En prenant ces études comme références, le protocole chez la souris serait d'injecter 5 nmol d'AcBs F6 X 679 puis après un intervalle de 48 h, d'injecter 0,5 nmol d'haptène. Selon le matériel de détection, l'activité injectée devra être de 12 MBq à 8 MBq. Avec une caméra micro-TEP ayant une bonne résolution, l'AS de l'haptène radiomarqué devra être au minimum de 16 MBq / nmol. Dans notre étude, l'activité spécifique maximale a été calculée à 7,2 MBq / nmol pour l'HBED. Celle-ci était donc inférieure à l'AS minimale attendue pour réaliser la méthode AES. Notre système de radiomarquage ne semble donc pas applicable en l'état à la technique AES. L'obtention d'un générateur de plus forte activité est donc une

## Discussion générale

condition indispensable. Elle s'accompagne nécessairement de l'utilisation d'un système de synthèse complètement automatisé.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

---

Les résultats de ce travail ont permis de valider la production par voie chimique de petites quantités d'AcBs en maintenant un rendement de production élevée. L'analyse par calorimétrie a permis de mesurer pour la première fois l'affinité du versant 679 pour l'haptène. Enfin, le radiomarquage de l'HBED en tampon acétate a été validé avec un éluat de  $^{68}\text{Ga}$  en NaCl / HCl et rend possible l'utilisation de la technique de purification de Mueller pour les futures études réalisées *in vivo* avec le système AcBs F6 x 679 / haptène di-HSGL.

Les perspectives de ce travail sont nombreuses. En effet, depuis le dépôt du brevet de l'haptène en 2004, aucune validation du système n'a encore été publiée. Les études réalisées avec le  $^{68}\text{Ga}$  pourront donc servir de preuve de concept et permettre de débiter des essais de ce système en radiothérapie interne vectorisée (RIV).

En effet, la technique en deux temps par AES possède surtout un intérêt en RIV dans les tumeurs solides. Pour ces tumeurs, les premiers essais avec des Acm radiomarqués donnaient des résultats très décevants (306). Comme nous l'avons déjà vu, la plus faible sensibilité aux radiations de ce type de tumeur et la difficulté de diffusion du vecteur radiomarqué au sein de la masse tumorale sont à la base de la faible efficacité de cette technique. Enfin, la dosimétrie aux organes sains est trop élevée notamment pour les vecteurs de hauts poids moléculaires comme les  $\text{F}(\text{ab}')_2$  ou les Acm. Le système par AES peut donc être une alternative de premier choix car l'haptène possède un poids moléculaire faible qui améliore la diffusion de la molécule radiomarquée et augmente la rapidité de son excrétion.

Dans ce cas, le remplacement de l'HBED sur l'haptène par d'autres chélatants ou synthons permet de proposer son radiomarquage avec de nombreux émetteurs  $\beta^-$  ou  $\alpha$  ( $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{213}\text{Bi}$  ou  $^{211}\text{At}$ ). En effet, la structure de l'haptène permet une fonctionnalisation sélective qui n'altère pas sa reconnaissance par l'AcBs.

Pour l'AcBs, la synthèse telle qu'elle a été proposée lors de ce travail peut donner lieu à de multiples indications. Pour notre AcBs dont la cible est l'ACE, des indications en immunoscintigraphie et en RIV sont possibles dans les cancers digestifs (carcinomes colorectal, gastrique et pancréatique) et dans certains cancers du sein, du tractus uro-génital, du poumon et de la thyroïde. L'utilisation d'autres Acm pour la production de l'AcBs peut encore augmenter le nombre de cibles potentielles et donc les indications. Les études

## Conclusion et perspectives

réalisées avec l'AcBs hMN14 x 679 dans les années 90 prouvent que la plupart des AcBs, même humanisés, sont une source potentielle de production d'un nouvel AcBs.

Enfin, ce système peut donner lieu à des travaux en théranostique car de plus en plus de couples de radionucléides sont disponibles pour réaliser ce type d'études, comme par exemple les couples :  $^{64}\text{Cu} / ^{67}\text{Cu}$ ,  $^{86}\text{Y} / ^{90}\text{Y}$  ou  $^{124}\text{I} / ^{131}\text{I}$ . Le système AcBs synthétisé par voie chimique / haptène di-HSGL ouvrirait la voie à de nouveaux traitements anti-cancéreux personnalisé et serait une alternative ou une thérapie adjuvante intéressante pour les cliniciens.

## RÉFÉRENCES

---

1. Edelman GM, Gally JA. The nature of Bence-Jones proteins. Chemical similarities to polypeptide chains of myeloma globulins and normal gamma-globulins. *J Exp Med.* 1962;116:207-27.
2. Potter M, Boyce CR. Induction of plasma-cell neoplasms in strain BALB/c mice with mineral oil and mineral oil adjuvants. *Nature.* 1962;193:1086-7.
3. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. Chapter 4. Antibodies: structure and function. *Kuby Immunology.* 6th Ed. 2008.
4. Goldsby RA, Kindt TJ, Kuby J, Osborne BA. *Immunology, Fifth Edition.* 5th ED. 2002.
5. Hansel TT, Kropshofer H, Singer T, Mitchell JA, George AJT. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(4):325-38.
6. Kabat EA, Wu TT, Bilofsky H. Unusual distributions of amino acids in complementarity-determining (hypervariable) segments of heavy and light chains of immunoglobulins and their possible roles in specificity of antibody-combining sites. *J Biol Chem.* 1977;252(19):6609-16.
7. Baty D, Chames P. Approved antibodies for imaging and therapeutic: an update. *Immuno-Anal Biol Spéc.* 2006;21:255-63.
8. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256(5517):495-7.
9. Beck A, Wurch T, Bailly C, Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(5):345-52.
10. Khazaeli MB, Conry RM, LoBuglio AF. Human immune response to monoclonal antibodies. *J Immunother Emphas Tumor Immunol Off J Soc Biol Ther.* 1994;15(1):42-52.
11. George Andrew J, Urch CE. *Diagnostic and Therapeutic Antibodies* [Internet]. Humana Press. 2000 [cité 31 mars 2014]. 477 p. Disponible sur: <http://cid.oxfordjournals.org/content/32/4/670>
12. Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(21):6851-5.
13. Boulianne GL, Hozumi N, Shulman MJ. Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature.* 1984;312(5995):643-6.

## Références bibliographiques

14. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. Chapter 5. Organization and expression of immunoglobulin genes. *Kuby Immunology*. 6th Ed. 2008.
15. Reichert JM. Antibody-based therapeutics to watch in 2011. *mAbs*. 2011;3(1):76-99.
16. Wong JYC, Shibata S, Williams LE, Kwok CS, Liu A, Chu DZ, et al. A Phase I trial of 90Y-anti-carcinoembryonic antigen chimeric T84.66 radioimmunotherapy with 5-fluorouracil in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2003;9(16.1):5842-52.
17. Van der Laken CJ, Voskuyl AE, Roos JC, Stigter van Walsum M, de Groot ER, Wolbink G, et al. Imaging and serum analysis of immune complex formation of radiolabelled infliximab and anti-infliximab in responders and non-responders to therapy for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2007;66(2):253-6.
18. Mazarakis A, Tsigkas G, Soufras GD, Kounis NG. Anti chimeric antibodies against chimeric monoclonal antibodies may result in Kounis hypersensitivity associated acute coronary syndrome. *J Crohns Colitis*. 2012;6(5):632-3.
19. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*. 1986;321(6069):522-5.
20. Ducancel F, Muller BH. Molecular engineering of antibodies for therapeutic and diagnostic purposes. *mAbs*. 2012;4(4):445-57.
21. Baca M, Presta LG, O'Connor SJ, Wells JA. Antibody humanization using monovalent phage display. *J Biol Chem*. 1997;272(16):10678-84.
22. Rader C, Cheresch DA, Barbas CF 3rd. A phage display approach for rapid antibody humanization: designed combinatorial V gene libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(15):8910-5.
23. Orlandi R, Güssow DH, Jones PT, Winter G. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. 1989. *Biotechnol Read Mass*. 1992;24:527-31.
24. Griffiths AD, Williams SC, Hartley O, Tomlinson IM, Waterhouse P, Crosby WL, et al. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J*. 1994;13(14):3245-60.
25. Kelley B. Industrialization of mAb production technology: the bioprocessing industry at a crossroads. *mAbs*. 2009;1(5):443-52.
26. Kopp-Kubel S. *bulletin de l'OMS*. 1995;73.
27. Scheen A. Nomenclature internationale des différents types d'anticorps monoclonaux. *Rev Med Liège*. 2009;64(5-6):244-7.

## Références bibliographiques

28. Cerny T, Borisch B, Introna M, Johnson P, Rose AL. Mechanism of action of rituximab. *Anticancer Drugs*. 2002;13 Suppl 2:S3-10.
29. European Medicines Agency - Find medicine - Herceptin [Internet]. [cité 4 avr 2014]. Disponible sur: <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000278/>
30. European Medicines Agency - Find medicine - Avastin [Internet]. [cité 4 avr 2014]. Disponible sur: <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000582/>
31. Reichert JM, Dhimolea E. The future of antibodies as cancer drugs. *Drug Discov Today*. 2012;17(17-18):954-63.
32. Willemar.a. Anon - Nobel Lectures - Chemistry (1922-1941). *Ann Chim Fr*. 1966;1(5-6):256.
33. Fang X. Conception et intégration d'une chaîne de lecture faible bruit en technologie CMOS pour un système TEP à base d'APD dédié à l'imagerie du petit animal [physique]. Strasbourg; 2011.
34. International Atomic Energy Agency. Planning a Clinical PET centre. 2010;20.
35. comité d'évaluation des technologies de santé. Point sur : L'imagerie TEP-IRM [Internet]. [cité 5 août 2014]. Disponible sur: <http://cedit.aphp.fr/hospital-based-hta-levaluation-de-technologies-de-sante-a-lhopital/point-sur-limagerie-tep-irm/>
36. Andrew SM, Perkins AC, Pimm MV, Baldwin RW. A comparison of iodine and indium labelled anti CEA intact antibody, F(ab)<sub>2</sub> and Fab fragments by imaging tumour xenografts. *Eur J Nucl Med*. 1988;13(11):598-604.
37. Faivre-Chauvet A, Gestin JF, Mease RC, Sai-Maurel C, Thédrez P, Slinkin M, et al. Introduction of five potentially metabolizable linking groups between <sup>111</sup>In-cyclohexyl EDTA derivatives and F(ab')<sub>2</sub> fragments of anti-carcinoembryonic antigen antibody--II. Comparative pharmacokinetics and biodistribution in human colorectal carcinoma-bearing nude mice. *Nucl Med Biol*. 1993;20(6):763-71.
38. Boucher Y, Baxter LT, Jain RK. Interstitial pressure gradients in tissue-isolated and subcutaneous tumors: implications for therapy. *Cancer Res*. 1990;50(15):4478-84.
39. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
40. Weinstein JN, Osdol W van. Early Intervention in Cancer Using Monoclonal Antibodies and Other Biological Ligands: Micropharmacology and the « Binding Site Barrier ». *Cancer Res*. 1992;52(9 Supplement):2747s - 2751s.

## Références bibliographiques

41. Jain RK. Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. *Cancer Res.* 1990;50(3 Suppl):814s - 819s.
42. Boswell CA, Brechbiel MW. Development of radioimmunotherapeutic and diagnostic antibodies: an inside-out view. *Nucl Med Biol.* 2007;34(7):757-78.
43. Trikha M, Yan L, Nakada MT. Monoclonal antibodies as therapeutics in oncology. *Curr Opin Biotechnol.* 2002;13(6):609-14.
44. Voorzanger-Rousselot N, Garnero P. Biochemical markers in oncology. Part I: Molecular basis. Part II: Clinical uses. *Cancer Treat Rev.* 2007;33(3):230-83.
45. Fujimori K, Covell DG, Fletcher JE, Weinstein JN. Modeling analysis of the global and microscopic distribution of immunoglobulin G, F(ab')<sub>2</sub>, and Fab in tumors. *Cancer Res.* 1989;49(20):5656-63.
46. Juweid M, Neumann R, Paik C, Perez-Bacete MJ, Sato J, van Osdol W, et al. Micropharmacology of monoclonal antibodies in solid tumors: direct experimental evidence for a binding site barrier. *Cancer Res.* 1992;52(19):5144-53.
47. Saga T, Neumann RD, Heya T, Sato J, Kinuya S, Le N, et al. Targeting cancer micrometastases with monoclonal antibodies: a binding-site barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(19):8999-9003.
48. Tang Y, Lou J, Alpaugh RK, Robinson MK, Marks JD, Weiner LM. Regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IgG intrinsic and apparent affinity for target antigen. *J Immunol.* 2007;179(5):2815-23.
49. Kraeber-Bodéré F, Faivre-Chauvet A, Ferrer L, Vuillez J-P, Brard P-Y, Rousseau C, et al. Pharmacokinetics and dosimetry studies for optimization of anti-carcinoembryonic antigen x anti-hapten bispecific antibody-mediated pretargeting of Iodine-131-labeled hapten in a phase I radioimmunotherapy trial. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2003;9(10):3973S - 81S.
50. Rudnick SI, Adams GP. Affinity and avidity in antibody-based tumor targeting. *Cancer Biother Radiopharm.* 2009;24(2):155-61.
51. Dijkers EC, Oude Munnink TH, Kosterink JG, Brouwers AH, Jager PL, de Jong JR, et al. Biodistribution of <sup>89</sup>Zr-trastuzumab and PET imaging of HER2-positive lesions in patients with metastatic breast cancer. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;87(5):586-92.
52. Jaggi JS, Carrasquillo JA, Seshan SV, Zanzonico P, Henke E, Nagel A, et al. Improved tumor imaging and therapy via i.v. IgG-mediated time-sequential modulation of neonatal Fc receptor. *J Clin Invest.* 2007;117(9):2422-30.
53. Tamura K, Kurihara H, Yonemori K, Tsuda H, Suzuki J, Kono Y, et al. <sup>64</sup>Cu-DOTA-trastuzumab PET imaging in patients with HER2-positive breast cancer. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 2013;54(11):1869-75.

## Références bibliographiques

54. Mortimer JE, Bading JR, Colcher DM, Conti PS, Frankel PH, Carroll MI, et al. Functional imaging of human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer using (64)Cu-DOTA-trastuzumab PET. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 2014;55(1):23-9.
55. Costantini DL, McLarty K, Lee H, Done SJ, Vallis KA, Reilly RM. Antitumor effects and normal-tissue toxicity of 111In-nuclear localization sequence-trastuzumab in athymic mice bearing HER-positive human breast cancer xenografts. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 2010;51(7):1084-91.
56. Rizvi SNF, Visser OJ, Vosjan MJWD, van Lingen A, Hoekstra OS, Zijlstra JM, et al. Biodistribution, radiation dosimetry and scouting of 90Y-ibritumomab tiuxetan therapy in patients with relapsed B-cell non-Hodgkin's lymphoma using 89Zr-ibritumomab tiuxetan and PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2012;39(3):512-20.
57. The MICAD Research Team. (111)In-ibritumomab tiuxetan. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004 [cité 25 mars 2014]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK23236/>
58. Nagengast WB, de Korte MA, Oude Munnink TH, Timmer-Bosscha H, den Dunnen WF, Hollema H, et al. 89Zr-bevacizumab PET of early antiangiogenic tumor response to treatment with HSP90 inhibitor NVP-AUY922. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 2010;51(5):761-7.
59. Gaykema SBM, Brouwers AH, Lub-de Hooge MN, Pleijhuis RG, Timmer-Bosscha H, Pot L, et al. 89Zr-bevacizumab PET imaging in primary breast cancer. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 2013;54(7):1014-8.
60. Perk LR, Visser GWM, Vosjan MJWD, Stigter-van Walsum M, Tijink BM, Leemans CR, et al. (89)Zr as a PET surrogate radioisotope for scouting biodistribution of the therapeutic radiometals (90)Y and (177)Lu in tumor-bearing nude mice after coupling to the internalizing antibody cetuximab. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 2005;46(11):1898-906.
61. Aerts HJWL, Dubois L, Perk L, Vermaelen P, van Dongen GAMS, Wouters BG, et al. Disparity between in vivo EGFR expression and 89Zr-labeled cetuximab uptake assessed with PET. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 2009;50(1):123-31.
62. Nayak TK, Garmestani K, Milenic DE, Brechbiel MW. PET and MRI of metastatic peritoneal and pulmonary colorectal cancer in mice with human epidermal growth factor receptor 1-targeted 89Zr-labeled panitumumab. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 2012;53(1):113-20.
63. Chang AJ, De Silva RA, Lapi SE. Development and characterization of 89Zr-labeled panitumumab for immuno-positron emission tomographic imaging of the epidermal growth factor receptor. *Mol Imaging.* 2013;12(1):17-27.

## Références bibliographiques

64. Divgi CR, Uzzo RG, Gatsonis C, Bartz R, Treutner S, Yu JQ, et al. Positron emission tomography/computed tomography identification of clear cell renal cell carcinoma: results from the REDECT trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013;31(2):187-94.
65. Steffens MG, Boerman OC, Oosterwijk-Wakka JC, Oosterhof GO, Witjes JA, Koenders EB, et al. Targeting of renal cell carcinoma with iodine-131-labeled chimeric monoclonal antibody G250. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1997;15(4):1529-37.
66. Cheal SM, Punzalan B, Doran MG, Evans MJ, Osborne JR, Lewis JS, et al. Pairwise comparison of (89)Zr- and (124)I-labeled cG250 based on positron emission tomography imaging and nonlinear immunokinetic modeling: in vivo carbonic anhydrase IX receptor binding and internalization in mouse xenografts of clear-cell renal cell carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014;41(5):985-94.
67. Rice SL, Roney CA, Daumar P, Lewis JS. The Next Generation of Positron Emission Tomography Radiopharmaceuticals in Oncology. *Semin Nucl Med*. 2011;41(4):265-82.
68. Carrasquillo JA, Pandit-Taskar N, O'Donoghue JA, Humm JL, Zanzonico P, Smith-Jones PM, et al. (124)I-huA33 antibody PET of colorectal cancer. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2011;52(8):1173-80.
69. Schrijvers AH, Quak JJ, Uyterlinde AM, van Walsum M, Meijer CJ, Snow GB, et al. MAb U36, a novel monoclonal antibody successful in immunotargeting of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res*. 1993;53(18):4383-90.
70. Börjesson PKE, Jauw YWS, Boellaard R, de Bree R, Comans EFI, Roos JC, et al. Performance of immuno-positron emission tomography with zirconium-89-labeled chimeric monoclonal antibody U36 in the detection of lymph node metastases in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2006;12(7 Pt 1):2133-40.
71. Börjesson PKE, Jauw YWS, de Bree R, Roos JC, Castelijns JA, Leemans CR, et al. Radiation dosimetry of 89Zr-labeled chimeric monoclonal antibody U36 as used for immuno-PET in head and neck cancer patients. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2009;50(11):1828-36.
72. Fortin M-A, Salnikov AV, Nestor M, Heldin N-E, Rubin K, Lundqvist H. Immuno-PET of undifferentiated thyroid carcinoma with radioiodine-labelled antibody cMAb U36: application to antibody tumour uptake studies. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007;34(9):1376-87.
73. Chacko A-M, Li C, Nayak M, Mikitsh JL, Hu J, Hou C, et al. Development of 124I Immuno-PET Targeting Tumor Vascular TEM1/Endosialin. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2014;55(3):500-7.
74. Rettig WJ, Garin-Chesa P, Healey JH, Su SL, Jaffe EA, Old LJ. Identification of endosialin, a cell surface glycoprotein of vascular endothelial cells in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(22):10832-6.

## Références bibliographiques

75. Engle JW, Hong H, Zhang Y, Valdovinos HF, Myklejord DV, Barnhart TE, et al. Positron emission tomography imaging of tumor angiogenesis with a <sup>66</sup>Ga-labeled monoclonal antibody. *Mol Pharm*. 2012;9(5):1441-8.
76. Brouwers A, Mulders P, Oosterwijk E, Buijs W, Corstens F, Boerman O, et al. Pharmacokinetics and tumor targeting of <sup>131</sup>I-labeled F(ab')<sub>2</sub> fragments of the chimeric monoclonal antibody G250: preclinical and clinical pilot studies. *Cancer Biother Radiopharm*. 2004;19(4):466-77.
77. Beylgeril V, Morris PG, Smith-Jones PM, Modi S, Solit D, Hudis CA, et al. Pilot study of <sup>68</sup>Ga-DOTA-F(ab')<sub>2</sub>-trastuzumab in patients with breast cancer. *Nucl Med Commun*. 2013;34(12):1157-65.
78. Ma T, Sun X, Cui L, Gao L, Wu Y, Liu H, et al. Molecular Imaging Reveals Trastuzumab-Induced Epidermal Growth Factor Receptor Downregulation In Vivo. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2014;
79. Wehrman TS, Raab WJ, Casipit CL, Doyonnas R, Pomerantz JH, Blau HM. A system for quantifying dynamic protein interactions defines a role for Herceptin in modulating ErbB2 interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(50):19063-8.
80. Zhang Y, Hong H, Engle JW, Bean J, Yang Y, Leigh BR, et al. Positron emission tomography imaging of CD105 expression with a <sup>64</sup>Cu-labeled monoclonal antibody: NOTA is superior to DOTA. *PloS One*. 2011;6(12):e28005.
81. Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, et al. Single-chain antigen-binding proteins. *Science*. 1988;242(4877):423-6.
82. Anand NN, Mandal S, MacKenzie CR, Sadowska J, Sigurskjold B, Young NM, et al. Bacterial expression and secretion of various single-chain Fv genes encoding proteins specific for a Salmonella serotype B O-antigen. *J Biol Chem*. 1991;266(32):21874-9.
83. Merk H, Stiege W, Tsumoto K, Kumagai I, Erdmann VA. Cell-free expression of two single-chain monoclonal antibodies against lysozyme: effect of domain arrangement on the expression. *J Biochem (Tokyo)*. 1999;125(2):328-33.
84. Yang K, Basu A, Wang M, Chintala R, Hsieh M-C, Liu S, et al. Tailoring structure-function and pharmacokinetic properties of single-chain Fv proteins by site-specific PEGylation. *Protein Eng*. 2003;16(10):761-70.
85. Yazaki PJ, Kassa T, Cheung C, Crow DM, Sherman MA, Bading JR, et al. Biodistribution and tumor imaging of an anti-CEA single-chain antibody-albumin fusion protein. *Nucl Med Biol*. 2008;35(2):151-8.
86. Verhaar MJ, Keep PA, Hawkins RE, Robson L, Casey JL, Pedley B, et al. Technetium-99m radiolabeling using a phage-derived single-chain Fv with a C-terminal cysteine. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 1996;37(5):868-72.

## Références bibliographiques

87. Nedelman MA, Shealy DJ, Boulin R, Brunt E, Seasholtz JI, Allen IE, et al. Rapid infarct imaging with a technetium-99m-labeled antimyosin recombinant single-chain Fv: evaluation in a canine model of acute myocardial infarction. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 1993;34(2):234-41.
88. Reilly RM, Maiti PK, Kiarash R, Prashar AK, Fast DG, Entwistle J, et al. Rapid imaging of human melanoma xenografts using an scFv fragment of the human monoclonal antibody H11 labelled with <sup>111</sup>In. *Nucl Med Commun*. 2001;22(5):587-95.
89. Schott ME, Milenic DE, Yokota T, Whitlow M, Wood JF, Fordyce WA, et al. Differential metabolic patterns of iodinated versus radiometal chelated anticarcinoma single-chain Fv molecules. *Cancer Res*. 1992;52(22):6413-7.
90. Adams GP, Schier R, McCall AM, Crawford RS, Wolf EJ, Weiner LM, et al. Prolonged in vivo tumour retention of a human diabody targeting the extracellular domain of human HER2/neu. *Br J Cancer*. 1998;77(9):1405-12.
91. Leyton JV, Olafsen T, Sherman MA, Bauer KB, Aghajanian P, Reiter RE, et al. Engineered humanized diabodies for microPET imaging of prostate stem cell antigen-expressing tumors. *Protein Eng Des Sel PEDS*. 2009;22(3):209-16.
92. Robinson MK, Doss M, Shaller C, Narayanan D, Marks JD, Adler LP, et al. Quantitative immuno-positron emission tomography imaging of HER2-positive tumor xenografts with an iodine-124 labeled anti-HER2 diabody. *Cancer Res*. 2005;65(4):1471-8.
93. Sundaresan G, Yazaki PJ, Shively JE, Finn RD, Larson SM, Raubitschek AA, et al. <sup>124</sup>I-labeled engineered anti-CEA minibodies and diabodies allow high-contrast, antigen-specific small-animal PET imaging of xenografts in athymic mice. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2003;44(12):1962-9.
94. Olafsen T, Sirk SJ, Betting DJ, Kenanova VE, Bauer KB, Ladno W, et al. ImmunoPET imaging of B-cell lymphoma using <sup>124</sup>I-anti-CD20 scFv dimers (diabodies). *Protein Eng Des Sel PEDS*. 2010;23(4):243-9.
95. Olafsen T, Cheung C-W, Yazaki PJ, Li L, Sundaresan G, Gambhir SS, et al. Covalent disulfide-linked anti-CEA diabody allows site-specific conjugation and radiolabeling for tumor targeting applications. *Protein Eng Des Sel PEDS*. 2004;17(1):21-7.
96. McCabe KE, Liu B, Marks JD, Tomlinson JS, Wu H, Wu AM. An engineered cysteine-modified diabody for imaging activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)-positive tumors. *Mol Imaging Biol MIB Off Publ Acad Mol Imaging*. 2012;14(3):336-47.
97. Cai W, Olafsen T, Zhang X, Cao Q, Gambhir SS, Williams LE, et al. PET imaging of colorectal cancer in xenograft-bearing mice by use of an <sup>18</sup>F-labeled T84.66 anti-carcinoembryonic antigen diabody. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2007;48(2):304-10.

## Références bibliographiques

98. Eder M, Knackmuss S, Le Gall F, Reusch U, Rybin V, Little M, et al. 68Ga-labelled recombinant antibody variants for immuno-PET imaging of solid tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010;37(7):1397-407.
99. Olafsen T, Sirk SJ, Olma S, Shen CK-F, Wu AM. ImmunoPET using engineered antibody fragments: fluorine-18 labeled diabodies for same-day imaging. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2012;33(3):669-77.
100. Viola-Villegas N, Sevak KK, Carlin SD, Doran MG, Evans HW, Bartlett DW, et al. Non-invasive imaging of PSMA in prostate tumors with 89Zr-labeled huJ591 engineered antibody fragments: The faster alternatives. *Mol Pharm*. 2014;
101. Goel A, Colcher D, Baranowska-Kortylewicz J, Augustine S, Booth BJ, Pavlinkova G, et al. Genetically engineered tetravalent single-chain Fv of the pancarcinoma monoclonal antibody CC49: improved biodistribution and potential for therapeutic application. *Cancer Res*. 2000;60(24):6964-71.
102. King DJ, Turner A, Farnsworth AP, Adair JR, Owens RJ, Pedley RB, et al. Improved tumor targeting with chemically cross-linked recombinant antibody fragments. *Cancer Res*. 1994;54(23):6176-85.
103. Pack P, Plückthun A. Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric FV fragments with high avidity in *Escherichia coli*. *Biochemistry (Mosc)*. 1992;31(6):1579-84.
104. Willuda J, Kubetzko S, Waibel R, Schubiger PA, Zangemeister-Wittke U, Plückthun A. Tumor targeting of mono-, di-, and tetravalent anti-p185(HER-2) miniantibodies multimerized by self-associating peptides. *J Biol Chem*. 2001;276(17):14385-92.
105. Cuesta AM, Sainz-Pastor N, Bonet J, Oliva B, Alvarez-Vallina L. Multivalent antibodies: when design surpasses evolution. *Trends Biotechnol*. 2010;28(7):355-62.
106. Hu S, Shively L, Raubitschek A, Sherman M, Williams LE, Wong JY, et al. Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Res*. 1996;56(13):3055-61.
107. Wu AM, Yazaki PJ, Tsai S w, Nguyen K, Anderson AL, McCarthy DW, et al. High-resolution microPET imaging of carcinoembryonic antigen-positive xenografts by using a copper-64-labeled engineered antibody fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(15):8495-500.
108. Olafsen T, Tan GJ, Cheung C-W, Yazaki PJ, Park JM, Shively JE, et al. Characterization of engineered anti-p185HER-2 (scFv-CH3)<sub>2</sub> antibody fragments (minibodies) for tumor targeting. *Protein Eng Des Sel PEDS*. 2004;17(4):315-23.
109. Leyton JV, Olafsen T, Lepin EJ, Hahm S, Bauer KB, Reiter RE, et al. Humanized radioiodinated minibody for imaging of prostate stem cell antigen-expressing tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2008;14(22):7488-96.

## Références bibliographiques

110. Tavaré R, McCracken MN, Zettlitz KA, Knowles SM, Salazar FB, Olafsen T, et al. Engineered antibody fragments for immuno-PET imaging of endogenous CD8+ T cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(3):1108-13.
111. Olafsen T, Betting D, Kenanova VE, Salazar FB, Clarke P, Said J, et al. Recombinant anti-CD20 antibody fragments for small-animal PET imaging of B-cell lymphomas. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2009;50(9):1500-8.
112. Tijink BM, Perk LR, Budde M, Stigter-van Walsum M, Visser GWM, Kloet RW, et al. (124)I-L19-SIP for immuno-PET imaging of tumour vasculature and guidance of (131)I-L19-SIP radioimmunotherapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2009;36(8):1235-44.
113. Heuveling DA, de Bree R, Vugts DJ, Huisman MC, Giovannoni L, Hoekstra OS, et al. Phase 0 microdosing PET study using the human mini antibody F16SIP in head and neck cancer patients. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2013;54(3):397-401.
114. Lefranc M-P, Giudicelli V, Ginestoux C, Jabado-Michaloud J, Folch G, Bellahcene F, et al. IMGT(R), the international ImMunoGeneTics information system(R) [Internet]. *Nucleic Acids Research*. 2009 [cité 4 août 2011]. Disponible sur: [http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/protein/human/IGH/IGHC/Hu\\_IGHCallgenes.html](http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/protein/human/IGH/IGHC/Hu_IGHCallgenes.html)
115. Poli GL, Bianchi C, Virota G, Bettini A, Moretti R, Trachsel E, et al. Radretumab Radioimmunotherapy in Patients with Brain Metastasis: A 124I-L19SIP Dosimetric PET Study. *Cancer Immunol Res*. 2013;1(2):134-43.
116. Schneider DW, Heitner T, Alicke B, Light DR, McLean K, Satozawa N, et al. In vivo biodistribution, PET imaging, and tumor accumulation of 86Y- and 111In-antimindin/RG-1, engineered antibody fragments in LNCaP tumor-bearing nude mice. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2009;50(3):435-43.
117. Kenanova V, Olafsen T, Crow DM, Sundaresan G, Subbarayan M, Carter NH, et al. Tailoring the pharmacokinetics and positron emission tomography imaging properties of anti-carcinoembryonic antigen single-chain Fv-Fc antibody fragments. *Cancer Res*. 2005;65(2):622-31.
118. Kenanova V, Olafsen T, Williams LE, Ruel NH, Longmate J, Yazaki PJ, et al. Radioiodinated versus Radiometal-Labeled Anti-Carcinoembryonic Antigen Single-Chain Fv-Fc Antibody Fragments: Optimal Pharmacokinetics for Therapy. *Cancer Res*. 2007;67(2):718-26.
119. Stillebroer AB, Franssen GM, Mulders PFA, Oyen WJG, van Dongen GAMS, Laverman P, et al. ImmunoPET imaging of renal cell carcinoma with (124)I- and (89)Zr-labeled anti-CAIX monoclonal antibody cG250 in mice. *Cancer Biother Radiopharm*. 2013;28(7):510-5.
120. Fischer E, Chaitanya K, Wüest T, Wadle A, Scott AM, van den Broek M, et al. Radioimmunotherapy of fibroblast activation protein positive tumors by rapidly

## Références bibliographiques

- internalizing antibodies. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2012;18(22):6208-18.
121. Kuespert K, Pils S, Hauck CR. CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18(5):565-71.
122. Taheri M, Saragovi U, Fuks A, Makkerh J, Mort J, Stanners CP. Self recognition in the Ig superfamily. Identification of precise subdomains in carcinoembryonic antigen required for intercellular adhesion. *J Biol Chem.* 2000;275(35):26935-43.
123. Hammarström S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol.* 1999;9(2):67-81.
124. Ordoñez C, Screatton RA, Ilantzis C, Stanners CP. Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis. *Cancer Res.* 2000;60(13):3419-24.
125. Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med.* 1965;122(3):467-81.
126. Thomson DM, Krupey J, Freedman SO, Gold P. The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969;64(1):161-7.
127. Chetanneau A, Barbet J, Peltier P, Le Doussal JM, Gruaz-Guyon A, Bernard AM, et al. Pretargetted imaging of colorectal cancer recurrences using an <sup>111</sup>In-labelled bivalent hapten and a bispecific antibody conjugate. *Nucl Med Commun.* 1994;15(12):972-80.
128. Goldenberg DM, Chang C-H, Rossi EA, J W, McBride, Sharkey RM. Pretargeted molecular imaging and radioimmunotherapy. *Theranostics.* 2012;2(5):523-40.
129. Salaun P-Y, Campion L, Bournaud C, Faivre-Chauvet A, Vuillez J-P, Taieb D, et al. Phase II trial of anticarcinoembryonic antigen pretargeted radioimmunotherapy in progressive metastatic medullary thyroid carcinoma: biomarker response and survival improvement. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 2012;53(8):1185-92.
130. Kraeber-Bodéré F, Salaun P-Y, Ansquer C, Drui D, Mirallié E, Faivre-Chauvet A, et al. Pretargeted radioimmunotherapy (pRAIT) in medullary thyroid cancer (MTC). *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* 2012;33(3):601-6.
131. Crocker PR, Redelinghuys P. Siglecs as positive and negative regulators of the immune system. *Biochem Soc Trans.* 2008;36(6):1467.
132. Nitschke L. The role of CD22 and other inhibitory co-receptors in B-cell activation. *Curr Opin Immunol.* 2005;17(3):290-7.
133. Torres RM, Law CL, Santos-Argumedo L, Kirkham PA, Grabstein K, Parkhouse RM, et al. Identification and characterization of the murine homologue of CD22, a B lymphocyte-restricted adhesion molecule. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1992;149(8):2641-9.

## Références bibliographiques

134. Leonard JP, Coleman M, Ketas JC, Chadburn A, Furman R, Schuster MW, et al. Epratuzumab, a humanized anti-CD22 antibody, in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: phase I/II clinical trial results. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2004;10(16):5327-34.
135. Leonard JP, Coleman M, Ketas J, Ashe M, Fiore JM, Furman RR, et al. Combination antibody therapy with epratuzumab and rituximab in relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2005;23(22):5044-51.
136. Morschhauser F, Kraeber-Bodéré F, Wegener WA, Harousseau J-L, Petillon M-O, Huglo D, et al. High Rates of Durable Responses With Anti-CD22 Fractionated Radioimmunotherapy: Results of a Multicenter, Phase I/II Study in Non-Hodgkin's Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2010;28(23):3709-16.
137. Wallace DJ, Goldenberg DM. Epratuzumab for systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2013;22(4):400-5.
138. Hnatowich DJ, Virzi F, Rusckowski M. Investigations of avidin and biotin for imaging applications. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 1987;28(8):1294-302.
139. Sharkey RM, Karacay H, Griffiths GL, Behr TM, Blumenthal RD, Mattes MJ, et al. Development of a streptavidin-anti-carcinoembryonic antigen antibody, radiolabeled biotin pretargeting method for radioimmunotherapy of colorectal cancer. Studies in a human colon cancer xenograft model. *Bioconjug Chem.* 1997;8(4):595-604.
140. Weiden PL, Breitz HB, Press O, Appelbaum JW, Bryan JK, Gaffigan S, et al. Pretargeted radioimmunotherapy (PRIT) for treatment of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): initial phase I/II study results. *Cancer Biother Radiopharm.* 2000;15(1):15-29.
141. Paganelli G, Chinol M, Maggiolo M, Sidoli A, Corti A, Baroni S, et al. The three-step pretargeting approach reduces the human anti-mouse antibody response in patients submitted to radioimmunoscintigraphy and radioimmunotherapy. *Eur J Nucl Med.* 1997;24(3):350-1.
142. Paganelli G, Magnani P, Zito F, Villa E, Sudati F, Lopalco L, et al. Three-step monoclonal antibody tumor targeting in carcinoembryonic antigen-positive patients. *Cancer Res.* 1991;51(21):5960-6.
143. Reardan DT, Meares CF, Goodwin DA, McTigue M, David GS, Stone MR, et al. Antibodies against metal chelates. *Nature.* 1985;316(6025):265-8.
144. Stickney DR, Anderson LD, Slater JB, Ahlem CN, Kirk GA, Schweighardt SA, et al. Bifunctional antibody: a binary radiopharmaceutical delivery system for imaging colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 1991;51(24):6650-5.
145. Le Doussal JM, Martin M, Gautherot E, Delaage M, Barbet J. In vitro and in vivo targeting of radiolabeled monovalent and divalent haptens with dual specificity monoclonal antibody conjugates: enhanced divalent hapten affinity for cell-bound antibody conjugate. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 1989;30(8):1358-66.

## Références bibliographiques

146. Le Doussal JM, Gruaz-Guyon A, Martin M, Gautherot E, Delaage M, Barbet J. Targeting of indium 111-labeled bivalent hapten to human melanoma mediated by bispecific monoclonal antibody conjugates: imaging of tumors hosted in nude mice. *Cancer Res.* 1 juin 1990;50(11):3445-52.
147. Janevik-Ivanovska E, Gautherot E, Hillairet de Boisferon M, Cohen M, Milhaud G, Tartar A, et al. Bivalent hapten-bearing peptides designed for iodine-131 pretargeted radioimmunotherapy. *Bioconjug Chem.* 1997;8(4):526-33.
148. Sharkey RM, McBride WJ, Karacay H, Chang K, Griffiths GL, Hansen HJ, et al. A Universal Pretargeting System for Cancer Detection and Therapy Using Bispecific Antibody. *Cancer Res.* 2003;63(2):354-63.
149. Glennie MJ, McBride HM, Worth AT, Stevenson GT. Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)2 antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1987;139(7):2367-75.
150. Tutt A, Stevenson GT, Glennie MJ. Trispecific F(ab')3 derivatives that use cooperative signaling via the TCR/CD3 complex and CD2 to activate and redirect resting cytotoxic T cells. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1991;147(1):60-9.
151. Rossi EA, Goldenberg DM, Cardillo TM, McBride WJ, Sharkey RM, Chang C-H. Stably tethered multifunctional structures of defined composition made by the dock and lock method for use in cancer targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2 mai 2006;103(18):6841-6.
152. Huisgen R. Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1963;2(11):633-45.
153. Tornøe CW, Christensen C, Meldal M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J Org Chem.* 2002;67(9):3057-64.
154. Rostovtsev VV, Green LG, Fokin VV, Sharpless KB. A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective « ligation » of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2002;41(14):2596-9.
155. Cai W, Zhang X, Wu Y, Chen X. A thiol-reactive 18F-labeling agent, N-[2-(4-18F-fluorobenzamido)ethyl]maleimide, and synthesis of RGD peptide-based tracer for PET imaging of alpha v beta 3 integrin expression. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 2006;47(7):1172-80.
156. Hausner SH, Marik J, Gagnon MKJ, Sutcliffe JL. In vivo positron emission tomography (PET) imaging with an alphavbeta6 specific peptide radiolabeled using 18F-« click » chemistry: evaluation and comparison with the corresponding 4-[18F]fluorobenzoyl- and 2-[18F]fluoropropionyl-peptides. *J Med Chem.* 2008;51(19):5901-4.

## Références bibliographiques

157. Knight JC, Cornelissen B. Bioorthogonal chemistry: implications for pretargeted nuclear (PET/SPECT) imaging and therapy. *Am J Nucl Med Mol Imaging*. 2014;4(2):96-113.
158. Vugts DJ, Vervoort A, Stigter-van Walsum M, Visser GWM, Robillard MS, Versteegen RM, et al. Synthesis of phosphine and antibody-azide probes for in vivo Staudinger ligation in a pretargeted imaging and therapy approach. *Bioconjug Chem*. 2011;22(10):2072-81.
159. Sletten EM, Bertozzi CR. From mechanism to mouse: a tale of two bioorthogonal reactions. *Acc Chem Res*. 2011;44(9):666-76.
160. Rossin R, Verkerk PR, van den Bosch SM, Vulders RCM, Verel I, Lub J, et al. In vivo chemistry for pretargeted tumor imaging in live mice. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010;49(19):3375-8.
161. Rossin R, Läppchen T, van den Bosch SM, Laforest R, Robillard MS. Diels-Alder reaction for tumor pretargeting: in vivo chemistry can boost tumor radiation dose compared with directly labeled antibody. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. nov 2013;54(11):1989-95.
162. Knox SJ, Goris ML, Tempero M, Weiden PL, Gentner L, Breitz H, et al. Phase II trial of yttrium-90-DOTA-biotin pretargeted by NR-LU-10 antibody/streptavidin in patients with metastatic colon cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2000;6(2):406-14.
163. Kraeber-Bodéré F, Rousseau C, Bodet-Milin C, Ferrer L, Faivre-Chauvet A, Campion L, et al. Targeting, toxicity, and efficacy of 2-step, pretargeted radioimmunotherapy using a chimeric bispecific antibody and <sup>131</sup>I-labeled bivalent hapten in a phase I optimization clinical trial. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. févr 2006;47(2):247-55.
164. Lewis MR, Wang M, Axworthy DB, Theodore LJ, Mallet RW, Fritzberg AR, et al. In vivo evaluation of pretargeted <sup>64</sup>Cu for tumor imaging and therapy. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2003;44(8):1284-92.
165. Cauchon N, Langlois R, Rousseau JA, Tessier G, Cadorette J, Lecomte R, et al. PET imaging of apoptosis with (<sup>64</sup>Cu)-labeled streptavidin following pretargeting of phosphatidylserine with biotinylated annexin-V. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2007;34(2):247-58.
166. Zeglis BM, Sevak KK, Reiner T, Mohindra P, Carlin SD, Zanzonico P, et al. A pretargeted PET imaging strategy based on bioorthogonal Diels-Alder click chemistry. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2013;54(8):1389-96.
167. McBride WJ, Zanzonico P, Sharkey RM, Norén C, Karacay H, Rossi EA, et al. Bispecific antibody pretargeting PET (immunoPET) with an <sup>124</sup>I-labeled hapten-peptide. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2006;47(10):1678-88.

## Références bibliographiques

168. Sharkey RM, Karacay H, Vallabhajosula S, McBride WJ, Rossi EA, Chang C-H, et al. Metastatic human colonic carcinoma: molecular imaging with pretargeted SPECT and PET in a mouse model. *Radiology*. 2008;246(2):497-507.
169. Schoffelen R, Sharkey RM, Goldenberg DM, Franssen G, McBride WJ, Rossi EA, et al. Pretargeted immuno-positron emission tomography imaging of carcinoembryonic antigen-expressing tumors with a bispecific antibody and a <sup>68</sup>Ga- and <sup>18</sup>F-labeled hapten peptide in mice with human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(4):1019-27.
170. Van Rij CM, Lütje S, Frielink C, Sharkey RM, Goldenberg DM, Franssen GM, et al. Pretargeted immuno-PET and radioimmunotherapy of prostate cancer with an anti-TROP-2 x anti-HSG bispecific antibody. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2013;40(9):1377-83.
171. Klivényi G, Schuhmacher J, Patzelt E, Hauser H, Matys R, Moock M, et al. Gallium-68 chelate imaging of human colon carcinoma xenografts pretargeted with bispecific anti-CD44V6/anti-gallium chelate antibodies. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 1998;39(10):1769-76.
172. Schuhmacher J, Klivényi G, Kaul S, Henze M, Matys R, Hauser H, et al. Pretargeting of human mammary carcinoma xenografts with bispecific anti-MUC1/anti-Ga chelate antibodies and immunoscintigraphy with PET. *Nucl Med Biol*. 2001;28(7):821-8.
173. Schuhmacher J, Kaul S, Klivényi G, Junkermann H, Magener A, Henze M, et al. Immunoscintigraphy with positron emission tomography: gallium-68 chelate imaging of breast cancer pretargeted with bispecific anti-MUC1/anti-Ga chelate antibodies. *Cancer Res*. 2001;61(9):3712-7.
174. Orcutt KD, Slusarczyk AL, Cieslewicz M, Ruiz-Yi B, Bhushan KR, Frangioni JV, et al. Engineering an antibody with picomolar affinity to DOTA chelates of multiple radionuclides for pretargeted radioimmunotherapy and imaging. *Nucl Med Biol*. 2011;38(2):223-33.
175. Nichols B, Qin Z, Yang J, Vera DR, Devaraj NK. (<sup>68</sup>Ga) chelating bioorthogonal tetrazine polymers for the multistep labeling of cancer biomarkers. *Chem Commun Camb Engl*. 2014;
176. Frampas E, Rousseau C, Bodet-Milin C, Barbet J, Chatal J-F, Kraeber-Bodéré F. Improvement of radioimmunotherapy using pretargeting. *Front Oncol*. 2013;3:159.
177. Firestone R, Browne E. Table of Radioactive Isotopes. *Abstr Pap Am Chem Soc*. 1985;190(SEP).
178. International Atomic Energy Agency. Cyclotron Produced Radionuclides: Physical Characteristics and Production Methods. IAEA; 2009.

## Références bibliographiques

179. Stang L, Tucker W, Doering R, Weiss A, Greene M, Banks H. Die Entwicklung Von Methoden Zur Erzeugung Kurzlebiger Radioisotope. *Angew Chem-Int Ed.* 1958;70(3):77-77.
180. Tucker W. Radioisotopic Cows. *J Nucl Med.* 1960;1(1):60-60.
181. Lieser K. Chemical Viewpoints for Developing Radionuclide Generators. *Radiochim Acta.* 1976;23(2):57-78.
182. Gleason GI. A positron cow. *Int J Appl Radiat Isot.* 1960;8(2-3):90-4.
183. Ehrhardt GJ, Welch MJ. A New Germanium-68/Gallium-68 Generator. *J Nucl Med.* 1978;19(8):925-9.
184. Grant P, O'Brien H, Mirzadeh S, Whipple R. Premature Evaluation of a Ge-68-]Ga-68 Distillation Generator. *J Nucl Med.* 1980;21(7):702-3.
185. Shehata MM, Scholten B, Spahn I, Qaim SM, Coenen HH. Radiochemical studies relevant to the separation of <sup>68</sup>Ga and <sup>68</sup>Ge. *J Radioanal Nucl Chem.* 2011;288(3):887-93.
186. Fritz JS, Gjerde DT. *Ion Chromatography.* 4th completely revised and enlarged ed. Wiley-VCH Verlag GmbH; 2009. 394 p.
187. Burgot G, Burgot J-L. *Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications : Méthodes chromatographiques, électrophorèses et méthodes spectrales.* Tec & Doc Lavoisier; 2002. 306 p.
188. Meyer G-J, Mäcke H, Schuhmacher J, Knapp WH, Hofmann M. <sup>68</sup>Ga-labelled DOTA-derivatised peptide ligands. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2004;31(8):1097-104.
189. Chakravarty R, Shukla R, Ram R, Tyagi AK, Dash A, Venkatesh M. Development of a nano-zirconia based <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generator for biomedical applications. *Nucl Med Biol.* 2011;38(4):575-83.
190. Yano Y, Anger H. A Gallium-68 Positron Cow for Medical Use. *J Nucl Med.* 1964;5(6):485-7.
191. Arino H, Skraba WJ, Kramer HH. A new <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga radioisotope generator system. *Int J Appl Radiat Isot.* 1978;29(2):117-20.
192. Kopecky P, Mudrova B. Ge-68 - Ga-68 generator for production of Ga-68 in an ionic form. *Int J Appl Radiat Isot.* 1974;25:263-8.
193. Hnatowich DJ. A method for the preparation and quality control of <sup>68</sup>Ga radiopharmaceuticals. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 1975;16(8):764-8.
194. Loch C, Maziere B, Comar D. New Generator for Ionic Ga-68. *J Nucl Med.* 1980;21(2):171-3.

## Références bibliographiques

195. Asti M, De Pietri G, Fraternali A, Grassi E, Sghedoni R, Fioroni F, et al. Validation of  $(68)\text{Ge}/(68)\text{Ga}$  generator processing by chemical purification for routine clinical application of  $(68)\text{Ga}$ -DOTATOC. *Nucl Med Biol.* 2008;35(6):721-4.
196. Malyshev KV, Smirnov VV. Generator of  $68\text{-Ga}$  based on zirconium hydroxide. *Radiokhimiya.* 1975;17(1):137-40.
197. Neirinckx RD, Davis MA. Potential column chromatography generators for ionic  $\text{Ga-68}$ . I. Inorganic substrates. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 1979;20(10):1075-9.
198. Ambe S.  $\text{Ge-68-Ga-68}$  generator with alpha-ferric oxide support. *Appl Radiat Isot.* 1988;39(1):49-51.
199. Bao B, Song M. A new  $\text{Ge-68/Ga-68}$  generator based on  $\text{CeO}_2$ . *J Radioanal Nucl Chem-Lett.* 1996;213(4):233-8.
200. Chakravarty R, Shukla R, Ram R, Venkatesh M, Dash A, Tyagi AK. Nanoceria-PAN Composite-Based Advanced Sorbent Material: A Major Step Forward in the Field of Clinical-Grade  $\text{Ge-68/Ga-68}$  Generator. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2010;2(7):2069-75.
201. Kurnevic.gi, Vishnevs.vb, Loiko E. Coordination-Compounds of Germanium(iv) with Polyhydric Phenols and Dimethyl-Sulfoxide. *Zhurnal Neorganicheskoi Khimii.* 1974;19(3):693-6.
202. Schuhmacher J, Maier-Borst W. A new  $68\text{Ge}/68\text{Ga}$  radioisotope generator system for production of  $68\text{Ga}$  in dilute HCl. *Int J Appl Radiat Isot.* 1981;32(1):31-6.
203. Neirinckx RD, Layne WW, Sawan SP, Davis MA. Development of an ionic  $68\text{Ge-68Ga}$  generator III. Chelate resins as chromatographic substrates for germanium. *Int J Appl Radiat Isot.* 1982;33(4):259-66.
204. Nakayama M, Haratake M, Ono M, Koiso T, Harada K, Nakayama H, et al. A new  $68\text{Ge}/68\text{Ga}$  generator system using an organic polymer containing N-methylglucamine groups as adsorbent for  $68\text{Ge}$ . *Appl Radiat Isot Data Instrum Methods Use Agric Ind Med.* 2003;58(1):9-14.
205. Ocak M, Antretter M, Knopp R, Kunkel F, Petrik M, Bergisadi N, et al. Full automation of  $(68)\text{Ga}$  labelling of DOTA-peptides including cation exchange prepurification. *Appl Radiat Isot Data Instrum Methods Use Agric Ind Med.* 2010;68(2):297-302.
206. De Blois E, Sze Chan H, Naidoo C, Prince D, Krenning EP, Breeman WAP. Characteristics of  $\text{SnO}_2$ -based  $68\text{Ge}/68\text{Ga}$  generator and aspects of radiolabelling DOTA-peptides. *Appl Radiat Isot Data Instrum Methods Use Agric Ind Med.* févr 2011;69(2):308-15.
207. Zhernosekov K, Harfensteller M, Moreno J, Leib O, Buck O, Tuerler A, et al. Development of a novel metal-free  $68\text{Ge}/68\text{Ga}$  radionuclide generator system. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2010;37(S2):S251-S251.

## Références bibliographiques

208. Breeman WAP, de Jong M, de Blois E, Bernard BF, Konijnenberg M, Krenning EP. Radiolabelling DOTA-peptides with  $^{68}\text{Ga}$ . *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2005;32(4):478-85.
209. Aardaneh K, van der Walt TN.  $\text{Ga}_2\text{O}_3$  for target, solvent extraction for radiochemical separation and  $\text{SnO}_2$  for the preparation of a  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  generator. *J Radioanal Nucl Chem*. 2006;268(1):25-32.
210. Blom E, Kozirowski J.  $\text{Ga-68}$ -Autoclabeling of DOTA-TATE and DOTA-NOC. *Appl Radiat Isot*. 2012;70(6):980-3.
211. Downs AJ. *Chemistry of Aluminium, Gallium, Indium, and Thallium*. Springer; 1993. 550 p.
212. Covidien imaging. Citrate de Gallium ( $^{67}\text{Ga}$ ), solution injectable. Résumé des caractéristiques produit. 1998.
213. IRSN, INRS. Gallium-67, Radioprotection : radionucléides. 2013.
214. Pearson RG. Hard and Soft Acids and Bases. *J Am Chem Soc*. 1963;85(22):3533-9.
215. Pearson RG. Chemical hardness and density functional theory. *J Chem Sci*. 2005;117(5):369-77.
216. Biechelin-Chassel M-L. Développement du radiomarquage de protéines à l'aide de Technétium et de Gallium. Mise au point sur les immunoglobulines et application à l'annexines A5 en vue de détecter de la mort cellulaire in vivo. [Th Doctorat]. Claude Bernard, Lyon 1; 2008.
217. Du Moulinet d'Hardemare A, Jarjayes O. Gallium, Indium, Thallium. Élément de post-transition du groupe 13. *Radiopharmaceutiques: Chimie des radiotraceurs et applications biologiques*. Presses Universitaires de Grenoble (PUG); 1999. p. 232-46.
218. Schwarzenbach G. Der Chelateffekt. *Helv Chim Acta*. 1952;35(7):2344-63.
219. Hancock RD, Martell AE. Ligand design for selective complexation of metal ions in aqueous solution. *Chem Rev*. 1989;89(8):1875-914.
220. Green MA, Welch MJ. Gallium radiopharmaceutical chemistry. *Int J Rad Appl Instrum B*. 1989;16(5):435-48.
221. Velikyan I, Beyer GJ, Långström B. Microwave-supported preparation of ( $^{68}\text{Ga}$ ) bioconjugates with high specific radioactivity. *Bioconjug Chem*. 2004;15(3):554-60.
222. Zoller F, Riss PJ, Montforts F-P, Rösch F. Efficient post-processing of aqueous generator eluates facilitates  $^{68}\text{Ga}$ -labelling under anhydrous conditions. *Radiochim Acta*. 2010;98(3):157-60.

## Références bibliographiques

223. Harris W, Pecoraro V. Thermodynamic Binding Constants for Gallium Transferrin. *Biochemistry (Mosc)*. 1983;22(2):292-9.
224. Price EW, Orvig C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chem Soc Rev*. 2014;43(1):260-90.
225. Lewis MR, Raubitschek A, Shively JE. A Facile, Water-Soluble Method for Modification of Proteins with DOTA. Use of Elevated Temperature and Optimized pH To Achieve High Specific Activity and High Chelate Stability in Radiolabeled Immunoconjugates. *Bioconjug Chem*. 1994;5(6):565-76.
226. Mier W, Hoffend J, Krämer S, Schuhmacher J, Hull WE, Eisenhut M, et al. Conjugation of DOTA Using Isolated Phenolic Active Esters: The Labeling and Biodistribution of Albumin as Blood Pool Marker. *Bioconjug Chem*. 2005;16(1):237-40.
227. Corson DT, Meares CF. Efficient Multigram Synthesis of the Bifunctional Chelating Agent (S)-1-p-Isothiocyanatobenzyl-diethylenetetraminepentaacetic Acid. *Bioconjug Chem*. 2000;11(2):292-9.
228. Chappell LL, Ma D, Milenic DE, Garmestani K, Venditto V, Beitzel MP, et al. Synthesis and evaluation of novel bifunctional chelating agents based on 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N''-N'''-tetraacetic acid for radiolabeling proteins. *Nucl Med Biol*. 2003;30(6):581-95.
229. Liu S, Edwards DS. Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals. *Bioconjug Chem*. 2001;12(1):7-34.
230. Maecke HR, André JP. <sup>68</sup>Ga-PET radiopharmacy: A generator-based alternative to <sup>18</sup>F-radiopharmacy. *Ernst Scher Res Found Workshop*. 2007;(62):215-42.
231. Fani M, André JP, Maecke HR. <sup>68</sup>Ga-PET: a powerful generator-based alternative to cyclotron-based PET radiopharmaceuticals. *Contrast Media Mol Imaging*. mars 2008;3(2):53-63.
232. Couturier O, Lacoeyille F, Lefebvre C, Hindre F, Vervueren L, Bouchet F, et al. Imagerie phénotypique et peptides radiomarqués au gallium-68 : au-delà des analogues de la somatostatine. *Médecine Nucl*. 2010;34(5):299-306.
233. Hofmann M, Maecke H, Börner R, Weckesser E, Schöffski P, Oei L, et al. Biokinetics and imaging with the somatostatin receptor PET radioligand (<sup>68</sup>Ga)-DOTATOC: preliminary data. *Eur J Nucl Med*. 2001;28(12):1751-7.
234. McMurry TJ, Brechbiel M, Kumar K, Gansow OA. Convenient synthesis of bifunctional tetraaza macrocycles. *Bioconjug Chem*. 1992;3(2):108-17.
235. Chappell LL, Rogers BE, Khazaeli MB, Mayo MS, Buchsbaum DJ, Brechbiel MW. Improved synthesis of the bifunctional chelating agent 1,4,7,10-tetraaza-N-(1-carboxy-3-(4-nitrophenyl)propyl)-N',N'',N'''-tris(acetic acid)cyclododecane (PA-DOTA). *Bioorg Med Chem*. 1999;7(11):2313-20.

## Références bibliographiques

236. Eisenwiener KP, Powell P, Mäcke HR. A convenient synthesis of novel bifunctional prochelators for coupling to bioactive peptides for radiometal labelling. *Bioorg Med Chem Lett.* 2000;10(18):2133-5.
237. Heppeler A, Froidevaux S, Mäcke HR, Jermann E, Béhé M, Powell P, et al. Radiometal-Labelled Macrocyclic Chelator-Derivatised Somatostatin Analogue with Superb Tumour-Targeting Properties and Potential for Receptor-Mediated Internal Radiotherapy. *Chem – Eur J.* 1999;5(7):1974-81.
238. Zeglis BM, Lewis JS. A practical guide to the construction of radiometallated bioconjugates for positron emission tomography. *Dalton Trans.* 2011;40(23):6168-95.
239. Ferreira CL, Lamsa E, Woods M, Duan Y, Fernando P, Bensimon C, et al. Evaluation of Bifunctional Chelates for the Development of Gallium-Based Radiopharmaceuticals. *Bioconjug Chem.* 2010;
240. Knetsch PA, Petrik M, Rangger C, Seidel G, Pietzsch H-J, Virgolini I, et al. [<sup>68</sup>Ga]NS<sub>3</sub>-RGD and [<sup>68</sup>Ga] Oxo-DO3A-RGD for imaging  $\alpha(v)\beta_3$  integrin expression: synthesis, evaluation, and comparison. *Nucl Med Biol.* 2013;40(1):65-72.
241. Kim WD, Hrcir DC, Kiefer GE, Sherry AD. Synthesis, Crystal Structure, and Potentiometry of Pyridine-Containing Tetraaza Macrocyclic Ligands with Acetate Pendant Arms. *Inorg Chem.* 1995;34(8):2225-32.
242. Velikyan I, Maecke H, Langstrom B. Convenient preparation of <sup>68</sup>Ga-based PET-radiopharmaceuticals at room temperature. *Bioconjug Chem.* 2008;19(2):569-73.
243. Eisenwiener KP, Prata MIM, Buschmann I, Zhang HW, Santos AC, Wenger S, et al. NODAGATOC, a new chelator-coupled somatostatin analogue labeled with [Ga-67/68] and [In-111] for SPECT, PET, and targeted therapeutic applications of somatostatin receptor (hsst2) expressing tumors. *Bioconjug Chem.* 2002;13(3):530-41.
244. Jeong JM, Hong MK, Chang YS, Lee Y-S, Kim YJ, Cheon GJ, et al. Preparation of a promising angiogenesis PET imaging agent: <sup>68</sup>Ga-labeled c(RGDyK)-isothiocyanatobenzyl-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid and feasibility studies in mice. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* mai 2008;49(5):830-6.
245. Singh AN, Liu W, Hao G, Kumar A, Gupta A, Öz OK, et al. Multivalent bifunctional chelator scaffolds for gallium-68 based positron emission tomography imaging probe design: signal amplification via multivalency. *Bioconjug Chem.* 2011;22(8):1650-62.
246. Andre JP, Maecke HR, Zehnder M, Macko L, Akyel KG. 1,4,7-triazacyclononane-1-succinic acid-4,7-diacetic acid (NODASA): a new bifunctional chelator for radio gallium-labelling of biomolecules. *Chem Commun.* 1998;(12):1301-2.
247. Riss PJ, Kroll C, Nagel V, Rösch F. NODAPA-OH and NODAPA-(NCS)<sub>n</sub>: synthesis, <sup>68</sup>Ga-radiolabelling and in vitro characterisation of novel versatile bifunctional chelators for molecular imaging. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008;18(20):5364-7.

## Références bibliographiques

248. Notni J, Hermann P, Havlickova J, Kotek J, Kubicek V, Plutnar J, et al. A Triazacyclononane-Based Bifunctional Phosphinate Ligand for the Preparation of Multimeric Ga-68 Tracers for Positron Emission Tomography. *Chem- Eur J.* 2010;16(24):7174-85.
249. Notni J, Pohle K, Wester H-J. Be spoilt for choice with radiolabelled RGD peptides: preclinical evaluation of <sup>68</sup>Ga-TRAP(RGD)<sub>3</sub>. *Nucl Med Biol.* 2013;40(1):33-41.
250. Šimeček J, Hermann P, Wester H-J, Notni J. How is (68)Ga labeling of macrocyclic chelators influenced by metal ion contaminants in (68)Ge/(68)Ga generator eluates? *ChemMedChem.* 2013;8(1):95-103.
251. Šimeček J, Schulz M, Notni J, Plutnar J, Kubíček V, Havlíčková J, et al. Complexation of metal ions with TRAP (1,4,7-triazacyclononane phosphinic acid) ligands and 1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid: phosphinate-containing ligands as unique chelators for trivalent gallium. *Inorg Chem.* 2012;51(1):577-90.
252. Boros E, Ferreira CL, Cawthray JF, Price EW, Patrick BO, Wester DW, et al. Acyclic Chelate with Ideal Properties for Ga-68 PET Imaging Agent Elaboration. *J Am Chem Soc.* 10 nov 2010;132(44):15726-33.
253. Boros E, Ferreira CL, Yapp DTT, Gill RK, Price EW, Adam MJ, et al. RGD conjugates of the H2dedpa scaffold: synthesis, labeling and imaging with 68Ga. *Nucl Med Biol.* 2012;39(6):785-94.
254. Berry DJ, Ma Y, Ballinger JR, Tavaré R, Koers A, Sunassee K, et al. Efficient bifunctional gallium-68 chelators for positron emission tomography: tris(hydroxypyridinone) ligands. *Chem Commun Camb Engl.* 2011;47(25):7068-70.
255. Mathias CJ, Lewis MR, Reichert DE, Laforest R, Sharp TL, Lewis JS, et al. Preparation of 66Ga- and 68Ga-labeled Ga(III)-deferoxamine-folate as potential folate-receptor-targeted PET radiopharmaceuticals. *Nucl Med Biol.* 2003;30(7):725-31.
256. Vosjan MJWD, Perk LR, Roovers RC, Visser GWM, Stigter-van Walsum M, van Bergen En Henegouwen PMP, et al. Facile labelling of an anti-epidermal growth factor receptor Nanobody with 68Ga via a novel bifunctional desferal chelate for immuno-PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2011;38(4):753-63.
257. Perk LR, Vosjan MJWD, Visser GWM, Budde M, Jurek P, Kiefer GE, et al. p-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine: a new bifunctional chelate for facile radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for immuno-PET imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2010;37(2):250-9.
258. Govindan SV, Michel RB, Griffiths GL, Goldenberg DM, Mattes MJ. Deferoxamine as a chelator for 67Ga in the preparation of antibody conjugates. *Nucl Med Biol.* 2005;32(5):513-9.

## Références bibliographiques

259. Eplattener FL, Murase I, Martell AE. New Multidentate Ligands. VI. Chelating Tendencies of N,N'-Di(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N'-diacetic Acid. *J Am Chem Soc.* 1967;89(4):837-43.
260. Schuhmacher J, Klivényi G, Hull WE, Matys R, Hauser H, Kalthoff H, et al. A bifunctional HBED-derivative for labeling of antibodies with <sup>67</sup>Ga, <sup>111</sup>In and <sup>59</sup>Fe. Comparative biodistribution with <sup>111</sup>In-DPTA and <sup>131</sup>I-labeled antibodies in mice bearing antibody internalizing and non-internalizing tumors. *Int J Rad Appl Instrum B.* 1992;19(8):809-24.
261. Eder M, Krivoshein AV, Backer M, Backer JM, Haberkorn U, Eisenhut M. ScVEGF-PEG-HBED-CC and scVEGF-PEG-NOTA conjugates: comparison of easy-to-label recombinant proteins for [Ga-68]PET imaging of VEGF receptors in angiogenic vasculature. *Nucl Med Biol.* 2010;37(4):405-12.
262. Zöllner M, Schuhmacher J, Reed J, Maier-Borst W, Matzku S. Establishment and characterization of monoclonal antibodies against an octahedral gallium chelate suitable for immunoscintigraphy with PET. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 1992;33(7):1366-72.
263. Eder M, Waengler B, Knackmuss S, LeGall F, Little M, Haberkorn U, et al. Tetrafluorophenolate of HBED-CC: a versatile conjugation agent for Ga-68-labeled small recombinant antibodies. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2008;35(10):1878-86.
264. Afshar-Oromieh A, Malcher A, Eder M, Eisenhut M, Linhart HG, Hadaschik BA, et al. PET imaging with a [<sup>68</sup>Ga]gallium-labelled PSMA ligand for the diagnosis of prostate cancer: biodistribution in humans and first evaluation of tumour lesions. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2013;40(4):486-95.
265. European Directorate for the Quality of Medicines. Gallium chloride (<sup>68</sup>Ga) solution for radiolabelling. Pharmeuropa; 2011.
266. Barrall RC, Chakalian VM, Colombetti LG, Finston RA. Purity tests of a <sup>68</sup>Ge-<sup>68</sup>Ga generator. *Int J Appl Radiat Isot.* 1971;22(3):149-54.
267. Mehard C, Volcani B. Similarity in Uptake and Retention of Trace Amounts of Silicon-31 and Germanium-68 in Rat Tissues and Cell Organelles. *Bioinorg Chem.* 1975;5(2):107-24.
268. Ando A, Ando I, Hiraki T, Hisada K. Relation Between the Location of Elements in the Periodic Table and Various Organ-Uptake Rates. *Nucl Med Biol.* 1989;16(1):57-80.
269. Konijnenberg M, Breeman W. Estimates for the biodistribution and dosimetry of <sup>68</sup>Ge in <sup>68</sup>Ga PET imaging. *J Labelled Compds Radiopharm [Internet].* 2009 [cité 4 avr 2012]. p. S116. Disponible sur: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jlcr.1653/pdf>
270. Sabbioni E, Fortaner S, Bosisio S, Farina M, Del Torchio R, Edel J, et al. Metabolic fate of ultratrace levels of GeCl<sub>4</sub> in the rat and in vitro studies on its basal cytotoxicity and

## Références bibliographiques

- carcinogenic potential in Balb/3T3 and HaCaT cell lines. *J Appl Toxicol.* 2010;30(1):34-41.
271. Decristoforo C, Pickett RD, Verbruggen A. Feasibility and availability of Ga-68-labelled peptides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2012;39:31-40.
272. International Atomic Energy Agency. Charged Particle Cross-section Database for Medical Radioisotope Production: Diagnostic Radioisotopes and Monitor Reactions. IAEA; 2001.
273. Naidoo C, van der Walt TN, Raubenheimer HG. Cyclotron production of Ge-68 with a Ga<sub>2</sub>O target. *J Radioanal Nucl Chem.* 2002;253(2):221-5.
274. Mirzadeh S, Lambrecht R. Radiochemistry of germanium. *J Radioanal Nucl Chem.* 1996;202(1):7-102.
275. Neirinckx RD, Davis MA. Potential column chromatography for ionic Ga-68. II: Organic ion exchangers as chromatographic supports. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 1980;21(1):81-3.
276. Strelow FW, Victor AH. Quantitative separation of Al, Ga, In, and Tl by cation exchange chromatography in hydrochloric acid-acetone. *Talanta.* sept 1972;19(9):1019-23.
277. Zhernosekov KP, Filosofov DV, Baum RP, Aschoff P, Bihl H, Razbash AA, et al. Processing of generator-produced <sup>68</sup>Ga for medical application. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 2007;48(10):1741-8.
278. Mueller D, Klette I, Baum RP, Gottschaldt M, Schultz MK, Breeman WAP. Simplified NaCl based (<sup>68</sup>Ga) concentration and labeling procedure for rapid synthesis of (<sup>68</sup>Ga) radiopharmaceuticals in high radiochemical purity. *Bioconjug Chem.* 2012;23(8):1712-7.
279. Van Rij CM, Frielink C, Goldenberg DM, Sharkey RM, Franssen GM, Lütje S, et al. Pretargeted ImmunoPET of Prostate Cancer with an Anti-TROP-2 x Anti-HSG Bispecific Antibody in Mice with PC3 Xenografts. *Mol Imaging Biol MIB Off Publ Acad Mol Imaging.* 2014;
280. Carlton JE, Hayes RL. Rapid separation of generator-produced gallium-68 from EDTA eluate. *Int J Appl Radiat Isot.* 1971;22(1):44-5.
281. Kulprathipanja S, Hnatowich DJ. A method for determining the pH stability range of gallium radiopharmaceuticals. *Int J Appl Radiat Isot.* 1977;28(1-2):229-33.
282. Schultz MK, Mueller D, Baum RP, Leonard Watkins G, Breeman WAP. A new automated NaCl based robust method for routine production of gallium-68 labeled peptides. *Appl Radiat Isot Data Instrum Methods Use Agric Ind Med.* 2013;76:46-54.

## Références bibliographiques

283. Impurities: Guidelines for residual solvents Q3C. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use; 2011.
284. Griffiths GL, Chang C-H, McBride WJ, Rossi EA, Sheerin A, Tejada GR, et al. Reagents and methods for PET using bispecific antibody pretargeting and <sup>68</sup>Ga-radiolabeled bivalent hapten-peptide-chelate conjugates. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 2004;45(1):30-9.
285. ABX Datasheet Product Number 9717 DOTA-NOC GMP [Internet]. [cité 8 août 2012]. Disponible sur: <http://www.abx.de/chemicals/9717.html>
286. Virgolini I, Ambrosini V, Bomanji J, Fanti S, Gabriel M, Papathanasiou N, et al. Procedure Guidelines For PET/CT Tumour Imaging with <sup>68</sup>Ga-DOTAconjugated peptides: <sup>68</sup>Ga-DOTA-TOC, <sup>68</sup>Ga-DOTA-NOC, <sup>68</sup>Ga-DOTA-TATE. *EANM*; 2010.
287. Faivre-Chauvet A, Gestin JF, Morandea L, Remaud-Le Saëc P. Novel compounds for uses in radioimmunosciintigraphy and/or radioimmunotherapy of cancers [Internet]. WO 2002040507 A3, 2002 [cité 19 oct 2014]. Disponible sur: <http://www.google.com/patents/WO2002040507A2>
288. Rousseaux J, Rousseaux-Prévost R, Bazin H. Optimal conditions for the preparation of Fab and F(ab')<sub>2</sub> fragments from monoclonal IgG of different rat IgG subclasses. *J Immunol Methods.* 11 nov 1983;64(1-2):141-6.
289. Lamoyi E, Nisonoff A. Preparation of F(ab')<sub>2</sub> fragments from mouse IgG of various subclasses. *J Immunol Methods.* 1983;56(2):235-43.
290. Stockmeyer B, Elsässer D, Dechant M, Repp R, Gramatzki M, Glennie MJ, et al. Mechanisms of G-CSF- or GM-CSF-stimulated tumor cell killing by Fc receptor-directed bispecific antibodies. *J Immunol Methods.* 2001;248(1-2):103-11.
291. Smyth DG, Blumenfeld OO, Konigsberg W. Reactions of N-ethylmaleimide with peptides and amino acids. *Biochem J.* 1964;91(3):589-95.
292. Gautherot E, Le Doussal JM, Bouhou J, Manetti C, Martin M, Rouvier E, et al. Delivery of therapeutic doses of radioiodine using bispecific antibody-targeted bivalent haptens. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* 1998;39(11):1937-43.
293. Morandea L, Benoist E, Loussouarn A, Ouali A, Lesaëc P, Mougin M, et al. Synthesis of new bivalent peptides for applications in the Affinity Enhancement System. *Bioconjug Chem.* 2005;16(1):184-93.
294. Gruaz-Guyon A, Janevik-Ivanovska E, Raguin O, De Labriolle-Vaylet C, Barbet J. Radiolabeled bivalent haptens for tumor immunodetection and radioimmunotherapy. *Q J Nucl Med Off Publ Ital Assoc Nucl Med AIMN Int Assoc Radiopharmacol IAR.* 2001;45(2):201-6.

## Références bibliographiques

295. Gruaz-Guyon A, Le Doussal JM, Delaage M, Barbet J. Dérivés bi-haptènes liant le technétium ou le rhénium procédé de préparation, application au diagnostic et à la thérapeutique, kits et réactifs immunologiques les renfermant [Internet]. EP 0595743 A1, 1994 [cité 19 oct 2014]. Disponible sur: <http://www.google.com/patents/EP0595743A1>
296. Delacroix D, Guerre J-P, Leblanc P. Guide pratique radionucléides et radioprotection (Nelle édition): Manuel pour la manipulation de substances radioactives dans les laboratoires de faible et moyenne activité. EDP Sciences; 2012. 273 p.
297. Lucena JJ, Barak P, HernandezApaolaza L. Isocratic ion-pair high-performance liquid chromatographic method for the determination of various iron(III) chelates. *J Chromatogr A*. 1996;727(2):253-64.
298. European Directorate for the Quality of Medicines. Gallium (68Ga) edotreotide injection. Pharmeuropa; 2011.
299. Clausen M, Ohman LO, Kubicki JD, Persson P. Characterisation of gallium(III)-acetate complexes in aqueous solution: A potentiometric, EXAFS, IR and molecular orbital modelling study. *J Chem Soc-Dalton Trans*. 2002;(12):2559-64.
300. Morfin J-F, Tóth É. Kinetics of Ga(NOTA) formation from weak Ga-citrate complexes. *Inorg Chem*. 2011;50(20):10371-8.
301. Krokhin OV, Kuzina OV, Hoshino H, Shpigun OA, Yotsuyanagi T. Potential of ethylenediaminedi(o-hydroxyphenylacetic acid) and N,N'-bis(hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N'-diacetic acid for the determination of metal ions by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*. 2000;890(2):363-9.
302. Kurono S, Kurono T, Komori N, Niwayama S, Matsumoto H. Quantitative proteome analysis using D-labeled N-ethylmaleimide and <sup>13</sup>C-labeled iodoacetanilide by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Bioorg Med Chem*. 15 déc 2006;14(24):8197-209.
303. Gautherot E, Rouvier E, Daniel L, Loucif E, Bouhou J, Manetti C, et al. Pretargeted radioimmunotherapy of human colorectal xenografts with bispecific antibody and <sup>131</sup>I-labeled bivalent hapten. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2000;41(3):480-7.
304. Frampas E, Maurel C, Remaud-Le Saëc P, Mauxion T, Faivre-Chauvet A, Davodeau F, et al. Pretargeted radioimmunotherapy of colorectal cancer metastases: models and pharmacokinetics predict influence of the physical and radiochemical properties of the radionuclide. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2011;38(12):2153-64.
305. Gestin JF, Loussouarn A, Bardiès M, Gautherot E, Gruaz-Guyon A, Saï-Maurel C, et al. Two-Step Targeting of Xenografted Colon Carcinoma Using a Bispecific Antibody and <sup>188</sup>Re-Labeled Bivalent Hapten: Biodistribution and Dosimetry Studies. *J Nucl Med*. 2001;42(1):146-53.

## Références bibliographiques

306. Navarro-Teulon I, Lozza C, Pèlerin A, Vivès E, Pouget J-P. General overview of radioimmunotherapy of solid tumors. *Immunotherapy*. 2013;5(5):467-87.

# ANNEXE 1 : TABLEAU DES ANTICORPS MONOCLONAUX POSSÉDANT UNE AMM

Dénomination	Spécialité	Cibles; type d'Acm	Indications
<b>adalimumab</b>	Humira®	anti-TNF; IgG1 humaine	arthrite juvénile idiopathique polyarticulaire, maladie de Crohn chez l'enfant
<b>bélimumab</b>	Benlysta®	anti-BLYS; IgG1 humaine	lupus systémique actif
<b>golimumab</b>	Simponi®	anti-TNF $\alpha$ ; IgG1 humaine	polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite ankylosante, rhumatisme psoriasique, rectocolite hémorragique
<b>ipilimumab</b>	Yervoy®	anti-CTL-A; IgG1 humaine	mélanome avancé
<b>dénosumab</b>	Prolia® / Xgeva®	anti-RANKL; IgG2 humaine	fracture liées à la perte osseuse associé à un traitement hormono-ablatif/ à des métastases osseuses; ostéoporose post-ménopausique
<b>canakinumab</b>	Ilaris®	anti-IL1 $\beta$ ; IgG1 humaine	syndromes périodiques associés à la cryopyrine, arthrite juvénile idiopathique, arthrite goutteuse
<b>ustékinumab</b>	Stelara®	anti-IL-12/13; IgG1 humaine	psoriasis
<b>ofatumumab</b>	Arzerra®	anti-CD20; IgG1 humaine	leucémie lymphoïde chronique
<b>panitumumab</b>	Vectibix®	anti-EGFR; IgG2 humaine	cancer colorectal métastatique
<b>besilésomab</b>	Scintimun®	anti-NCA-95; IgG1 murine conjugué au 99m-Tc	localisation et étendue de l'infection ou l'inflammation osseuse avec suspicion d'ostéomyélite
<b>ibritumomab tiuxétan</b>	Zevalin®	anti-CD20; IgG1 murine conjugué à l' <sup>90</sup> -Y	Lymphome folliculaire
<b>sulésomab</b>	Leukoscan®	anti-NCA-90; fragment Fab' murin conjugué au 99m-Tc	localisation et étendue de l'infection ou l'inflammation osseuse avec suspicion d'ostéomyélite
<b>catumaxomab</b>	Removab®	anti-CD3 et EpCAM; hybride rat-souris IgG2	ascites malins
<b>abciximab</b>	Reopro®	anti-GPIIb/IIIa R ; Fragment Fab chimérique	intervention coronarienne percutanée, angor instable

Annexe 1 – Tableau des anticorps monoclonaux possédant une AMM

<b>basiliximab</b>	Simulect®	anti-CD25; IgG1 chimérique	rejet aiguë de transplantation rénale allogénique
<b>infliximab</b>	Remicade®	anti-TNF $\alpha$ ; IgG1 chimérique	psoriasis, rectocolite hémorragique, spondylarthrite ankylosante, polyarthrite rhumatoïde et maladie de Crohn
<b>rituximab</b>	MabThera®	anti-CD20; IgG1 chimérique	Lymphome non hodgkinien; leucémie lymphoïde chronique, polyarthrite rhumatoïde et maladie de Wegner
<b>cétuximab</b>	Erbix®	anti-EGFR; IgG1 chimérique	cancer colorectal et carcinome épidermoïde de la tête et du cou
<b>brentuximab vedotine</b>	Adcetris®	anti-CD30 conjugué à un inhibiteur des microtubules; IgG1 chimérique	lymphome hodgkinien et lymphome anaplasique à grandes cellules
<b>bévacizumab</b>	Avastin®	anti-VEGF; IgG1 humanisée	cancer rein, colorectal, sein, ovarien, péritoine, bronchique non à petites cellules
<b>certolizumab pégol</b>	Cimzia®	anti-TNF $\alpha$ ; fragment Fab' humanisé	polyarthrite rhumatoïde, spondylarthrite axiale, rhumatisme psoriasique
<b>écilizumab</b>	Solaris®	anti-C5; IgG2/4 humanisée	hémoglobinurie nocturne paroxystique
<b>natalizumab</b>	Tysabri®	anti -intégrine $\alpha$ 4 $\beta$ 1; IgG4 humanisée	sclérose en plaques
<b>omalizumab</b>	Xolair®	anti-IgE; IgG1 humanisée	Asthme persistant sévère
<b>pavilizumab</b>	Synagis®	anti-protéine de fusion; IgG1 humanisée	infection au virus respiratoire syncytial
<b>pertuzumab</b>	Perjeta®	anti-HER2 ; IgG1 humanisée	cancer métastatique du sein
<b>ranibizumab</b>	Lucentis®	anti-VEGF-A; partie Fab humanisé du bévacizumab	dégénérescence maculaire, œdème maculaire du diabétique, néovascularisation chorioïdal
<b>tocilizumab</b>	RoActemra®	anti-IL-6 R; IgG1 humanisée	arthrite chronique idiopathique
<b>trastuzumab</b>	Herceptin®	anti-HER 2 ; IgG1 humanisée	cancer métastatique du sein
<b>trastuzumab emtansine</b>	Kadcyla®	anti-HER 2; IgG1 humanisée conjugué à un inhibiteur des microtubules	cancer avancé ou métastatique du sein



## ANNEXE 3 : RÉSULTATS DES BIODISTRIBUTIONS DES COMPLEXES

Organes	HBED à 10 min (% DI / g)	HBED à 60 min (% DI / g)	DOTA à 10min (% DI / g)	DOTA à 60min (% DI / g)
<b>Cerveau</b>	0,095 ± 0,05	0,046 ± 0,026	0,095 ± 0,059	0,023 ± 0,001
<b>Coeur</b>	0,868 ± 0,567	0,338 ± 0,243	0,868 ± 0,567	0,164 ± 0,020
<b>Estomac vidé</b>	1,785 ± 1,376	0,392 ± 0,136	1,785 ± 1,376	1,138 ± 1,709
<b>Foie</b>	3,574 ± 0,442	4,338 ± 2,524	3,574 ± 0,443	1,222 ± 0,886
<b>Intestin vidé</b>	0,600 ± 0,209	1,571 ± 1,128	0,600 ± 0,209	0,662 ± 0,689
<b>Muscle</b>	0,496 ± 0,362	0,154 ± 0,054	0,496 ± 0,363	0,164 ± 0,143
<b>Os (fémur)</b>	0,541 ± 0,330	0,222 ± 0,093	0,541 ± 0,330	0,249 ± 0,093
<b>Pancréas</b>	0,450 ± 0,234	0,205 ± 0,111	0,450 ± 0,234	0,275 ± 0,314
<b>Peau</b>	1,096 ± 0,801	0,403 ± 0,258	1,096 ± 0,801	0,311 ± 0,377
<b>Poumons</b>	5,890 ± 3,644	15,191 ± 13,004	5,890 ± 3,644	1,398 ± 1,026
<b>Rate</b>	2,609 ± 0,920	1,389 ± 0,498	2,609 ± 0,920	1,105 ± 0,676
<b>Rein cortex</b>	11,469 ± 9,901	1,819 ± 1,640	11,469 ± 9,902	1,439 ± 0,132
<b>Sang</b>	2,993 ± 2,336	0,833 ± 0,373	2,993 ± 2,336	0,408 ± 0,059
<b>Tractus sexuel</b>	1,737 ± 1,157	0,281 ± 0,92	1,737 ± 1,157	1,038 ± 0,983

# Thèse de Doctorat

Chloé LAMESA

**Technique diagnostique en deux temps pour l'imagerie moléculaire en oncologie : mise au point d'un anticorps bispécifique et études radiochimiques sur le marquage au  $^{68}\text{Ga}$**

**Affinity enhancement system for molecular imaging in oncology: new synthesis of bispecific antibody and radiochemistry studies of  $^{68}\text{Ga}$  radiolabelling**

## Résumé

L'imagerie TEP par la technique de préciblage, exposée dans cette thèse, est proposée avec le gallium-68. Ce travail s'articule en deux axes. La première partie évalue une nouvelle technique de production chimique par le *N,N'*-(*o*-phénylène)dimaléide d'un anticorps bispécifique ciblant à la fois un antigène tumoral et un haptène. La seconde partie étudie le radiomarquage et les propriétés radiochimiques des complexes du  $^{68}\text{Ga}$  avec différents chélatants pour la fonctionnalisation de l'haptène bivalent di-HSGL. L'optimisation de la technique de synthèse de l'anticorps bispécifique a montré qu'un pourcentage de 5 % (p/p) de pepsine est suffisant pour obtenir une digestion optimale de l'anticorps en  $\text{F}(\text{ab}')_2$ . Les études sur la réduction des ponts disulfures du  $\text{F}(\text{ab}')_2$  et sur l'intégrité des  $\text{Fab}'$  formés montrent qu'un réducteur doux limite la dégradation du  $\text{Fab}'$  tout en maintenant un bon rendement de réduction. L'étude d'affinité indique que l'affinité de l'anticorps bispécifique synthétisé avec le dimaleïde est suffisante pour le ciblage efficace de tumeurs positives à l'antigène CEA. La deuxième partie de ce travail concerne l'étude radiochimique du chélatant cyclique DOTA et acyclique HBED complexés au  $^{68}\text{Ga}$ . L'ensemble des résultats de radiomarquage et des études de stabilité semblent montrer que l'HBED est un chélatant de choix pour le radiomarquage de l'haptène avec le  $^{68}\text{Ga}$ . Son radiomarquage est réalisable à faible température et avec une activité spécifique supérieure à celle du DOTA. Le rendement de radiomarquage du complexe HBED- $^{68}\text{Ga}$  et l'optimisation de la technique doivent permettre d'injecter le peptide radiomarké sans purification du produit fini.

## Mots clés

Tomographie par Emission de Positons, préciblage, gallium-68, anticorps bispécifique, HBED, DOTA

## Abstract

In this study, the affinity enhancement system is proposed with nuclear imaging using gallium-68. This work is presented in two parts. The first part investigates new chemistry system used *N,N'*-(*o*-phenylene)dimaléide to produce a bispecific antibody which targets a tumour antigen and a hapten. The second part evaluates radiolabel and radiochemistry properties of  $^{68}\text{Ga}$  complexes using two chelators in order to radiolabel divalent hapten named di-HSGL. Synthesis optimisations show that the optimal digestion of antibody is realized with 5 % of pepsin (p/p).  $\text{F}(\text{ab}')_2$  reduction studies indicate that cysteamine, a soft powerful reducing agent, is enough to reduce disulfide bonds and does protect the integrity of created  $\text{Fab}'$ . Eventually, the affinity studies of the new divalent vector confirm the good affinity constants to both antigen and hapten. The second part presents radiochemistry studies of DOTA and HBED chelators for  $^{68}\text{Ga}$ . They show HBED is more interesting than DOTA to radiolabel hapten with  $^{68}\text{Ga}$ . Radiolabel is made at room temperature. Its specific activity is better than DOTA's one. Radiolabel rate and method optimization should allow to inject the final product without purification stage.

## Key Words

Positron Emissions Tomography, Affinity Enhancement System, gallium-68, Bispecific antibody, HBED, DOTA