

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE SCIENCES PHARMACEUTIQUES

**Étude de faisabilité de
Radio-Immuno-thérapie α
à l'astate-211**

THESE DE DOCTORAT

École Doctorale BIOLOGIE SANTE
Mention Sciences de la Vie et de la Santé
Discipline : Pharmacie
Spécialité : Radiopharmacie

présentée

et soutenue publiquement par

BOURGEOIS Mickaël

le 8 septembre 2009, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs : **M. GUILLOTEAU Denis.** PU-PH Faculté de Pharmacie de Tours
M. NOIRET Nicolas. Professeur Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes

Examineurs : **Mme RIZZO-PADOIN Nathalie.** Praticien Hospitalier – Hôpital Lariboisière APHP
M. PINEAU Alain. PU-PH Faculté de Pharmacie de Nantes

Directeur de thèse : **M. FAIVRE-CHAUVET Alain.** PU-PH Faculté de Pharmacie de Nantes

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à,

Madame Nathalie RIZZO-PADOIN, Pharmacien Praticien Hospitalier au CHU Lariboisière, pour m'avoir fait l'honneur d'avoir accepté d'être membre de ce jury et de bien vouloir juger mon travail. Qu'elle trouve dans ces quelques mots l'expression de mes sincères remerciements.

Monsieur Denis GUILLOTEAU, Pharmacien Praticien Hospitalier au CHU de Tours, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Tours, pour avoir éveillé l'intérêt envers la radiopharmacie chez le jeune étudiant que j'étais. Qu'il trouve ici le témoignage de ma plus sincère gratitude pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail de thèse.

Monsieur Nicolas NOIRET, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, pour ses nombreux conseils et idées issues de notre collaboration sur ce beau projet qu'est la radio-immunothérapie α . Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de ma profonde estime.

Monsieur Alain PINAUD, Pharmacien Praticien Hospitalier au CHU de Nantes, Professeur et Doyen de la Faculté de Pharmacie de Nantes, pour me faire l'honneur d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Qu'il reçoive ici le témoignage de ma reconnaissance et de ma profonde considération.

Je tiens à remercier tout particulièrement,

Monsieur Alain FAIVRE-CHAUVET, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Nantes et Praticien Hospitalier du CHU de Nantes, pour m'avoir dirigé pendant ce travail de thèse, encadré et formé à ce métier de radiopharmacien qui me passionne, inculqué dans la rigueur et la bonne humeur les principes du raisonnement scientifique, mais aussi pour sa bienveillance et sa gentillesse. Qu'il trouve ici l'expression sincère de mon amitié.

Messieurs et Madame Jean-François CHATAL, Olivier COUTURIER et Françoise KRAEBER-BODERE, pour m'avoir accueilli tout au long de mon cursus hospitalo-universitaire dans le service de Médecine Nucléaire du CHU de Nantes qu'ils ont successivement dirigé, qu'ils trouvent dans ces quelques mots le témoignage de ma reconnaissance pour m'avoir fait confiance et accordé du temps pour mener à bien ce travail de thèse.

Monsieur Jacques BARBET, notre Directeur d'équipe au Centre de Recherche en Cancérologie Nantes - Angers (unité INSERM U-892), pour m'avoir encouragé et guidé par ses polyvalences techniques et scientifiques tout au long de ce travail.

Monsieur Michel CHEREL, Maître de conférence à la faculté de Médecine de Nantes, pour sa sympathie, sa rigueur scientifique et surtout pour être le porteur nantais de ce projet de recherche qui, je l'espère un jour nous permettra de faire notre travail de pharmacien en traitant des patients...

Madame Isabelle FURIC-ROUILLER, Praticien Hospitalier et Chef de Service de la Pharmacie de l'Hôpital Laënnec de Nantes pour l'accueil et le soutien qu'elle m'a porté lors de mon cursus hospitalier ainsi que pour l'intérêt qu'elle porte à notre belle spécialité radiopharmaceutique.

Madame Marie MOUGIN-DEGRAEF, Maître de conférence à la Faculté de Pharmacie de Nantes et Praticien Hospitalier au CHU Nantes, conseil de la première heure pour ses conseils et son amitié.

Mademoiselle Cecile BOURDEAU, Radiopharmacien au cyclotron ARRONAX avec qui je partage un bureau et qui a eu la gentillesse de prendre en charge une partie de mon travail et de m'avoir ainsi libéré du temps pour la rédaction de ce travail.

Je voudrais également exprimer mon amitié,

A Brigitte et Géraldine, pour leur patience et leur enseignement du « tour de main » radiopharmaceutique et pour leur accueil au labo « chaud » de l'Hôtel – Dieu où j'ai fait mes premières armes.

Aux équipes des deux sites de Médecine Nucléaire des hôpitaux de Nantes pour m'avoir chaleureusement accueilli et pour le partage de leurs compétences respectives.

A l'équipe du cyclotron ARRONAX avec qui j'ai la chance de participer à la mise en route de cet ambitieux projet qui me permet de réaliser ma vocation première de pharmacien qui est de mettre à disposition des patients de nouveaux traitements.

A toute l'équipe de l'INSERM (et bien sûr de CHELATEC...), et plus particulièrement, pêle-mêle : Patricia, François D., Jeff, François G., Holisoa, Elliot, Ludo, Tony, Kamel, Anto, Ju, Stéphane, pour m'avoir accueilli, conseillé, et partagé tous ces petits instants de la vie (cafés, mots fléchés, gâteaux, surtout les gâteaux...)

A tous les internes Rochelais et Nantais, que j'ai eu la chance de côtoyer durant 5 ans de cette belle école qu'est la formation hospitalière.

A mes camarades du DESC de Radiopharmacie, pour le partage de vos expériences respectives au cours de nos séjours Saclaysiens.

Enfin, mes pensées vont tout naturellement à,

Nathalie, pour l'équilibre, l'amour et le soutien que tu m'apportes au quotidien. Merci pour le temps que tu as consacré à cette thèse (ces nombreuses heures de mise en page et de correction d'orthographe...). Bien évidemment je te dédie ce travail. Merci pour cette vie que je n'osais espérer.

Côme, tu es né pendant cette thèse et te voir grandir constitue la plus belle expérience de ma vie. Continue de grandir comme ça petit bonhomme (mais pas trop vite quand même...).

Mes parents, pour leur présence, pour m'avoir toujours soutenu et fait de moi ce que je crois être.

Franco, LaBrez, Ju et miniMI pour être mes fidèles compagnons de cordées et amis.

Pierre, pour son soutien et son amitié de toute une vie.

Et bien sûr, à l'ensemble de mes amis pour leur présence.

SOMMAIRE

Sommaire	p 1
Liste des abréviations et des symboles	p 5
Préambule	p 8
Données bibliographiques	p 11
Chapitre I : La Radio-immunothérapie - Généralités	p 12
I.1. Introduction	p 12
I.2. Effets biologiques des rayonnements ionisants	p 14
I.2.1. Effets cellulaires	p 14
I.2.2. Effets tissulaires	p 20
I.2.3. Principes de la radiothérapie	p 21
I.2.4. Notions de dosimétrie interne en médecine nucléaire	p 24
I.3. Le vecteur immunologique	p 27
I.3.1. Structure et caractéristique des immunoglobulines	p 28
I.3.2. Formes d'anticorps monoclonaux utilisable en thérapie	p 35
I.3.2.1. Formes entières d'anticorps monoclonaux	p 36
I.3.2.2. Formes fragmentées d'anticorps monoclonaux	p 38
I.3.3. Classification des anticorps monoclonaux	p 41
I.4. Choix du radionucléide	p 42
I.4.1. Critères physiques	p 42
I.4.1.1. Demi-vie du radionucléide	p 42
I.4.1.2. Type d'émission	p 43
I.4.2. Modalité de couplage	p 45
I.4.3. Modes de production	p 45
I.5. Caractéristiques tumorales	p 47
I.5.1. Nature de la cible tumorale	p 47
I.5.2. Nature de l'antigène tumoral	p 50
I.6. Utilisations cliniques de la radio-immunothérapie	p 52
I.7. Optimisation de la radio-immunothérapie	p 54
I.7.1. Amélioration sur le vecteur immunologique	p 55
I.7.1.1. Stratégies basée sur l'affinité Biotine/Avidine	p 55
I.7.1.2. Stratégies <i>Affinity Enhancement System</i>	p 56
I.7.2. Optimisation de l'activité spécifique et du radionucléide	p 58
Chapitre II : la Radio-immunothérapie alpha	p 62
II.1. Introduction	p 62
II.2. L'astate-211	p 64
II.2.1. Production de l'astate-211	p 64
II.2.2. Propriétés physiques de l'astate-211	p 66
II.2.2.1. Spectrométrie α	p 67
II.2.2.2. Spéctrométrie X et γ	p 68
II.2.3. Extraction et purification de l'astate	p 69

II.2.4. Propriétés biologiques de l'astate	p 70
II.2.5. Propriétés chimiques de l'astate	p 71
II.2.5.1. Chimie de complexation de l'astate	p 74
II.2.5.2. Chimie de covalence de l'astate	p 76
II.2.6. Couplage de l'astate à des structures protéiques	p 83
II.2.7. Essais pré-cliniques de radio-immunothérapie α à l'astate-211	p 89
II.2.7.1 Etudes d'efficacité	p 89
II.2.7.2 Etudes toxicologiques	p 90
II.2.7.3 Etudes de biodistribution	p 91
II.2.8. Essai clinique de radio-immunothérapie α à l'astate-211	p 93

Chapitre III : Partie expérimentale	p 95
III.1. Objectifs du travail de thèse	p 96
III.2. Extraction de l'astate-211	p 99
III.2.1. Introduction	p 99
III.2.2. Matériels et méthodes	p 100
III.2.2.1. Matières premières	p 100
III.2.2.2. Attaque acide de la cible	p 100
III.2.2.3. Titration de l'acide nitrique dans la phase organique	p 101
III.2.2.4. Evolution de l'astate dans la phase organique	p 101
III.2.3. Résultats et discussion	p 102
III.2.3.1. Extraction de la cible	p 102
III.2.3.2. Titrimétrie de l'acide nitrique	p 104
III.2.3.3. Evolution de l'astate en phase organique	p 104
III.3. Marquage du précurseur stannique	p 106
III.3.1. Introduction	p 106
III.3.2. Matériels et méthodes	p 107
III.3.2.1. Matières premières	p 107
III.3.2.2. Synthèse du précurseur stannique	p 107
III.3.2.3. Synthèse des références iodées	p 108
III.3.2.4. Radiomarquage du synthon astaté	p 109
III.3.3. Résultats et discussion	p 111
III.3.3.1. Synthèse du précurseur stannique	p 111
III.3.3.2. Synthèse des références iodées	p 112
III.3.3.3. Radiomarquage du synthon astaté	p 113
III.4. Couplage à une structure protéique	p 117
III.4.1. Introduction	p 117
III.4.2. Matériels et méthodes	p 118
III.4.2.1. Matières premières	p 118
III.4.2.2. Préparation des solutions tampons	p 118
III.4.2.3. Etude de l'hydrolyse de l'ester 3-[¹²⁵ I]iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle	p 119
III.4.2.4. Conditionnement des anticorps	p 119
III.4.2.5. Etude de l'influence des paramètres de couplage à l'anticorps	p 119
III.4.2.6. Marquage d'un anticorps à l'astate-211	p 120
III.4.3. Résultats et discussion	p 121
III.4.3.1. Etude de l'hydrolyse de l'ester 3-[¹²⁵ I]iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle	p 121
III.4.3.2. Conditionnement des anticorps	p 122
III.4.3.3. Etude de l'influence des paramètres de couplage à l'anticorps	p 123

III.4.3.4. Marquage d'un anticorps à l'astate	p 125
III.5. Stabilité <i>in vitro</i> du marquage	p 129
III.5.1. Introduction	p 129
III.5.2. Matériels et méthodes	p 129
III.5.2.1. Matières premières	p 129
III.5.2.2. Test de stabilité sérique	p 130
III.5.2.3. fixation protéique	p 130
III.5.3. Résultats et discussion	p 131
III.6. Etude de l'immunoréactivité	p 133
III.6.1. Introduction	p 133
III.6.2. Matériels et méthodes	p 134
III.6.3. Résultats et discussion	p 135
III.7. Etude <i>in vivo</i> de biodistribution	p 137
III.7.1. Introduction	p 137
III.7.2. Matériels et méthodes	p 137
III.7.2.1. Matières premières	p 137
III.7.2.2. Protocoles expérimentaux	p 138
III.7.3. Résultats et discussion	p 139
Chapitre IV : Discussion générale	p 144
IV.1. Optimisation du radiomarquage d'une immunoglobuline à l'astate-211	p 145
IV.2. Etude de stabilité et de biodistribution	p 149
IV.3. Perspectives	p 151
Conclusion	p 152
Bibliographie	p 155
Annexes	p 171
Index des figures et des tableaux	p 181

Liste des abréviations et des symboles

ACE : Antigène Carcino-Embryonnaire

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AES : Affinity Enhancement System

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ATE : Activated Tin Ester

BBT : Bleu de BromoThymol

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

Bq : Symbole du Becquerel

BSA : Bovin Serum Albumin

CAIX : Carbonic Anhydrase IX

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

Cdk : Cyclin dependent kinase

CD : Cluster de Différenciation

CDR : Complementary Determining Region

Ci : Symbole du Curie

CIPR : Commission Internationale de Protection Radiologique

CMT : Cancer Médullaire de la Thyroïde

cpm : Coups par minutes

DIPE : Di-isopropylether

DTPA : Diethylene Tetraamino Pentacétic Acid

EBR : Effets biologiques Relatifs

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

FDA : Food and Drug Administration

Gy : Symbole du Gray

HACA : Human Anti-Chimeric Antibody

HAMA : Human Anti-Mouse Antibody

HPLC : High Pressure Liquid Chromatography

HSAB : Hard Soft Acide Base

ICP-MS : Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry

Ig : Immunoglobuline

INF : Interféron

ITLC-SG : Instant Thin Layer Chromatography – Silica Gel

kb : kilo bases

kDa : kilo Dalton

keV : kilo électron-Volt

LLA : Leucémie Lymphoïde Aigüe

LMNH : Lymphome Malin Non-Hodgkinien

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MeV : Mega électron-Volt

Nal(Tl) : Cristal d'iodure de sodium dopé au thallium

NCS : N-ChloroSuccinimide

NHS : N-HydroxySuccinimide

NIS : Natrium / Iodide Symporter

PBS : Phosphate Buffer Saline

PEEK : PolyEtherEtherKetone

PI3K : Phosphatidyl Inositol-3-Phosphate Kinase

PSMA : Prostate-Specific-Membrane Antigens

RIT : Radio-ImmunoThérapie

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SAB : Succinimidyl Astato Benzoate

scFv : Single chain Fv

SE : Substitution Electrophile

SN : Substitution Nucléophile

Sv : Symbole du Sievert

TEL : Transfert d'Énergie Linéique

TEP : Tomographie par Emission de Positon

TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor

TSH : Thyroid Stimulating Hormon

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

PREAMBULE

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

Cette spécialité médicale utilise des radioisotopes à des fins diagnostiques ou thérapeutiques. L'imagerie isotopique ou scintigraphie présente la particularité d'être une imagerie fonctionnelle permettant d'étudier, via la localisation d'un signal émis par un radiopharmaceutique, les anomalies touchant le métabolisme de ce radiotraceur. Elle fait appel à l'utilisation de différents isotopes qui sont des émetteurs de photons gamma (comme le technétium-99m ou l'indium-111) ou des émetteurs de particules β^+ (comme le fluor-18). Elle représente à ce jour la grande majorité des examens réalisés en routine d'un service de médecine nucléaire.

Depuis quelques années, la médecine nucléaire connaît un net essor avec le développement des indications thérapeutiques. Dans ce cadre, les médecins nucléaires utilisent des vecteurs de radionucléides émetteurs de particules β^- (comme l'iode-131 ou l'yttrium-90) qui ont pour caractéristique de déposer une forte énergie à proximité de leur lieu d'émission et ainsi de détruire les tissus environnants. Malgré cette caractéristique favorable, les émetteurs de particules β^- sont à l'origine d'une irradiation sphérique de quelques millimètres à quelques centimètres à partir de leurs points d'émission. D'autre part, lorsque la cible biologique possède une taille à l'échelle cellulaire, il apparaît possible d'utiliser des émetteurs de particules α qui présentent l'intérêt particulier de déposer une très grande quantité d'énergie dans un volume de quelques micromètres.

Les caractéristiques physiques des émissions β^- ou α ne sont pas les seules qui doivent être prises en compte lorsque l'on veut utiliser des radionucléides à des fins thérapeutiques. Il faut également considérer le devenir du traceur dans l'organisme. Si le tropisme intrinsèque de l'iode pour la thyroïde permet un bon rapport entre l'irradiation de l'organe pathologique et des tissus sains, la médecine nucléaire a du développer des

vecteurs spécifiques pour des indications anti-tumorales ou palliatives que ce soit avec de l'iode-131 ou avec d'autres radionucléides. Le défi de la radiopharmacie fut donc de produire un vecteur qui idéalement, assure un transport efficace du traceur jusqu'à sa cible sans être métabolisé, et qui reste suffisamment longtemps en contact avec cette cible pour permettre une efficacité thérapeutique. Les temps de transits entre l'administration du vecteur radiomarqué et son arrivée sur la cible ainsi que celui nécessaire à son élimination de l'organisme devront être idéalement les plus courts possible car ils sont source d'irradiation non spécifiques. Les anticorps monoclonaux qui sont utilisés en clinique depuis une vingtaine d'année sont apparus comme un vecteur de choix en médecine nucléaire dans le traitement de pathologies cancéreuses.

Ce travail de thèse s'articule en 2 parties. La première partie, qui est scindée en 2 chapitres, regroupe les données bibliographiques sur le sujet et la seconde partie est consacrée au travail expérimental réalisé durant cette thèse.

Le premier chapitre replace la radio-immunothérapie dans la prise en charge de la pathologie cancéreuse et présente les mécanismes d'action des rayonnements ionisants sur des cellules vivantes, les différents types de vecteurs immunologiques utilisables en thérapie, les critères de choix d'un radionucléide, les caractéristiques tumorales d'intérêt dans cette approche thérapeutique ainsi que les différentes utilisations cliniques, leurs limites et leurs optimisations possible.

Le second chapitre présente une approche originale dans la radio-immunothérapie qui consiste à utiliser un radionucléide émetteur de particules α . Après une introduction générale sur cette voie particulière, nous présenterons un isotope s'avérant particulièrement intéressant dans cette indication : l'astate-211. Ce chapitre regroupera les informations spécifiques à cet élément comme ses moyens d'obtention, ses propriétés physiques et chimiques, les différents moyens testés pour le coupler à des structures protéiques de type anticorps ainsi que les essais pré-cliniques et cliniques qui ont pu être menés.

La seconde partie de ce travail de thèse est consacrée à une étude expérimentale menée au sein du Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers dans le laboratoire de l'unité INSERM U892 de Nantes. Elle a pour but d'étudier la faisabilité du radiomarquage de protéines de type immunoglobuline avec l'astate-211 obtenue par une technique originale d'extraction liquide. L'objectif principal de ce projet étant la mise au point d'une stratégie optimisée de marquage d'anticorps à l'astate-211 en vue d'essais pré-cliniques ultérieurs.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre I. La Radio-Immunothérapie - Généralités

I.1. Introduction

Les différents traitements de la pathologie cancéreuse actuellement utilisés sont classés en deux catégories : les traitements loco-regionaux dont la chirurgie et la majeure partie des traitements radiothérapeutiques et les traitements généraux ou systémiques représentés essentiellement par la chimiothérapie. Afin de choisir le meilleur traitement, plusieurs paramètres sont pris en compte comme le type de cancer, l'organe atteint, le stade d'évolution de la maladie et les différents facteurs pronostiques (état clinique, éléments biologiques sanguins, marqueurs tumoraux, données anatomo-pathologiques, résultats des diverses techniques d'imagerie,...). Dans la prise en charge de la maladie cancéreuse, les différentes armes thérapeutiques sont souvent associées, en alternance ou en concomitance. Dans la majorité des cas des tumeurs solides, le traitement de référence le plus efficace reste l'ablation chirurgicale de la tumeur. Ce traitement peut conduire à la guérison si la tumeur reste localisée. En présence de métastases, la chirurgie est souvent indiquée en première intention puis complétée par une radiothérapie ou une chimiothérapie pour éliminer les cellules métastatiques.

La radiothérapie, qui consiste à utiliser des sources d'irradiation externe (électrons ou photons X), permet de déposer des doses localisées élevées détruisant les cellules tumorales, cette irradiation entraîne néanmoins des effets secondaires le long du trajet des rayons notamment au niveau de la peau et des tissus sains environnants.

La chimiothérapie est un traitement généralement administré par voie systémique utilisant différentes molécules cytotoxiques ciblant les cellules en prolifération en bloquant leur capacité de multiplication. Ces molécules peuvent être administrées seules ou plus fréquemment en association de polychimiothérapie combinant des molécules présentant des effets cellulaires différents. Dans le traitement curatif des tumeurs solides, la chimiothérapie est en générale adjuvante à la chirurgie ou à la radiothérapie. L'efficacité de ce traitement est cependant souvent accompagnée d'effets secondaires importants liés à son action sur les cellules saines en prolifération (moelle osseuse, muqueuses, peau,...).

Les différentes stratégies thérapeutiques employées à ce jour sont hélas souvent insuffisantes car elles ne permettent pas d'atteindre l'ensemble des cellules malades. Compte tenu de cette limite au niveau des protocoles actuels et des effets secondaires occasionnés, de nouvelles voies de traitements ont été explorées.

Parmi ces nouvelles voies d'approche dans le traitement des pathologies cancéreuses est apparue l'idée d'utiliser les effets cytotoxiques des rayonnements ionisants (radiothérapie) associée à la spécificité de molécules immunologiques (immunothérapie). Cette approche permet un effet synergique entre l'immunothérapie présentant à elle seule un effet thérapeutique propre et les radiations ionisantes tout en traitant les cellules tumorales avec une grande spécificité afin de limiter la fixation au niveau des tissus sains et donc diminuer les effets secondaires cutanéomuqueux.

La radio-immunothérapie (RIT) est une forme de radiothérapie interne associant un agent immunologique de vectorisation (anticorps monoclonal ou fragment d'anticorps) à un radionucléide émetteur de particules α ou β^- qui induit la destruction des cellules ciblées. Dans ce chapitre seront exposés les effets biologiques des rayonnements ionisants ainsi que les quatre éléments conditionnant l'efficacité de la RIT. Les deux premiers font intervenir les propriétés du radioimmunoconjugué, avec les caractéristiques du vecteur immunologique (spécificité, affinité, dose, immunoréactivité) et celle du radionucléide (période, type d'émission, énergie). Les deux derniers éléments concernent la cible : nature de la cible tumorale (radiosensibilité, taille, vascularisation, taux de prolifération) et propriétés de l'antigène tumoral (localisation, densité, expression). À partir de ces différentes caractéristiques, nous verrons les principales utilisations cliniques actuellement à l'étude ainsi que les limites et optimisations potentielles de la RIT.

I.2. Effets biologiques des rayonnements ionisants

I.2.1. Effets cellulaires

L'irradiation d'une cellule produit une cascade d'événements qui sont dans un ordre chronologique : physiques, chimiques, biochimiques puis biologiques [2].

Durant la phase **physique** (10^{-18} à 10^{-13} secondes), les radiations agissent sur les atomes rencontrés en excitant (excitations simples) ou en éjectant des électrons de leur nuage électronique (ionisations).

La phase **chimique** dure de 10^{-13} à quelques secondes. Les ions formés durant la phase physique interagissent avec les molécules constitutives de la cellule, principalement l'eau (radiolyse de l'eau). Sur l'eau, ces interactions conduisent, par diverses réactions, à des ruptures de la molécule [3] produisant des agents très oxydants comme : le radical superoxyde ($\bullet\text{O}_2^-$), le radical hydroxyl ($\text{OH}\bullet$), des électrons libres (e^-_{aq}) ou du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par exemple. Ces agents sont responsables de l'attaque chimique des macromolécules cellulaires, et en particulier, de l'ADN. Cette phase de radiolyse de l'eau et d'attaque radicalaire de l'ADN est très largement dépendante de la présence d'oxygène et, dans ce cas, le rayonnement ionisant n'est pas l'acteur direct des effets sur les macromolécules biologiques, on parle alors « d'effet indirect ».

La phase **biochimique** commence quelques secondes après l'irradiation et s'étend sur plusieurs heures : les mécanismes de réparation de la cellule entrent en action pour restaurer l'ADN endommagé. La viabilité de la cellule irradiée dépend de la rapidité et de la fiabilité de cette réparation.

La phase **biologique** représente toutes les conséquences de la phase biochimique au niveau de la cellule et peut s'étendre sur plusieurs années. La cellule irradiée va activer des fonctions constitutives comme la réparation ou les voies de transduction des signaux depuis la membrane jusqu'au noyau. Il peut en résulter un très grand nombre de conséquences telles que l'expression de nombreux gènes et leurs produits protéiques, l'apparition membranaires de facteurs de croissance, la régulation de la mort cellulaire ou la modulation du cycle cellulaire.

En parallèle aux effets indirects consécutifs à la radiolyse de l'eau, la cellule peut subir des lésions par transfert d'énergie direct entre le rayonnement ionisant et la molécule d'ADN (Figure n°1). L'importance relative entre les effets directs et indirects dépend de la nature du rayonnement, de l'organisation de la molécule d'ADN et de l'hydratation cellulaire.

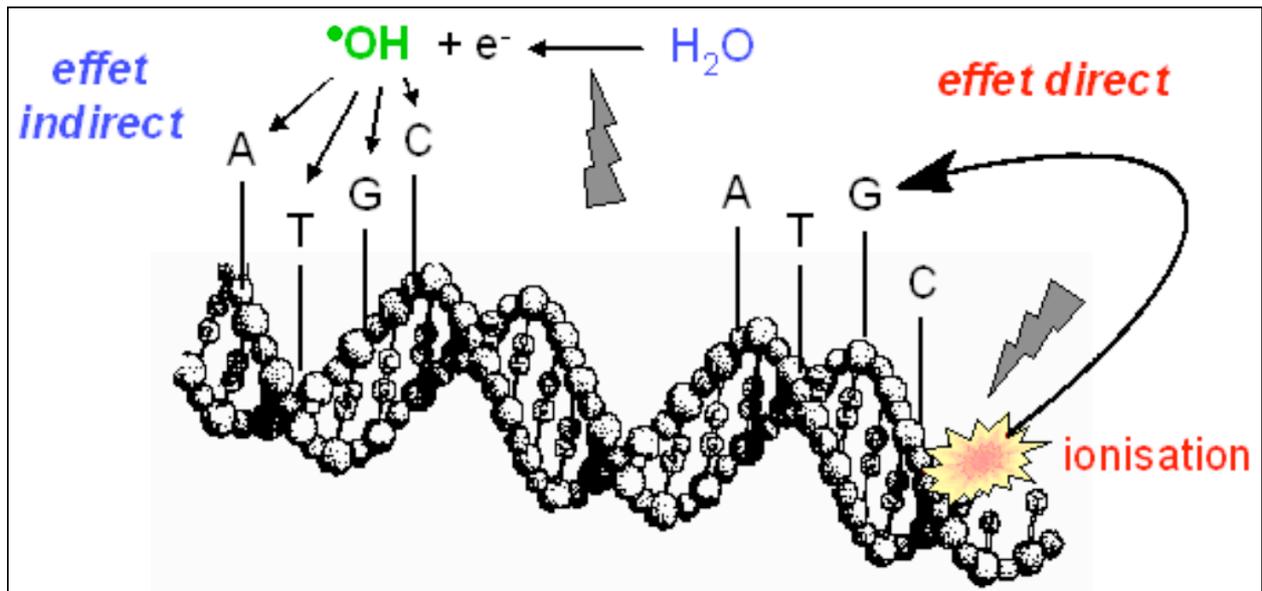


Figure n°1 : Effets directs (à droite) et indirects (à gauche) des rayonnements ionisants sur une molécule d'ADN (d'après [4]).

Les effets biologiques des rayonnements ionisants sur des cellules sont principalement expliqués par des altérations de la molécule d'ADN qui, en tant que support de l'information génétique, constitue la cible principale. Parmi les effets engendrés par les rayonnements ionisants sur l'ADN [5], les lésions les plus fréquemment observées sont (Tableau n°1) :

- des additions radicalaires ($\text{OH}\bullet$) sur les doubles liaisons des bases puriques (C_4 et C_8) et pyrimidiques (C_5 et C_6),
- des couplages par dimérisation de pyrimidines (pontage thymine-thymine par un cycle cyclobutane entre les C_5 et C_6 de deux thymines adjacentes),
- des hydrolyses de liaisons $N\text{-}\beta\text{-glycosyl}$ aboutissant à la déletion d'une purine (dépurination) le plus souvent,
- des ionisations de la chaîne désoxyribose (deshydrogénation du carbone C'_4),
- des cassures simples ou doubles brins de la molécule d'ADN (il est à noter que la cassure simple brin est facile à réparer puisque la matrice est intacte sur le brin complémentaire et que la cassure double brin est un événement difficilement réparable et rare mais induisant fréquemment la mort de la cellule),
- des pontages ADN-ADN (intra- ou inter-brins) aboutissant à des aberrations chromosomiques (anneaux centriques, insertion ...),
- des liaisons protéines-ADN (histones et protéines chromosomiques).

Tableau n°1 : Incidence des lésions à l'ADN par Gray et par cellule [6].

Type de lésion	Incidence des lésions
Domage sur les bases	800-2000
Domages sur désoxyribose	800-1600
Cassure simple brin	500-1000
Cassure double brin	40
Pontages ADN-ADN	30
Liaison avec des protéines	15

Des lésions cellulaires hors ADN nucléaire peuvent également être observées (Figure n°2) au niveau de la membrane cellulaire et du cytoplasme [5] avec pour conséquences :

- la libération d'acide arachidonique (phénomène inflammatoire),
- l'altération des canaux calciques et potassiques (troubles de l'homéostasie cellulaire),
- l'activation de la sphingomyélinase avec libération de céramide (messager dans la voie apoptotique de mort cellulaire par activation de la c-jun amino-terminal kinase),
- l'activation de l'oncoprotéine Bcl-2 susceptible d'inhiber la protéine p53 jouant un rôle clé dans la régulation du cycle cellulaire,
- l'activation de récepteurs aux cytokines (comme par exemple l'*epidermal growth factor* ou le *tumor necrosis factor*)
- l'activation de facteurs mitogènes (mitogen-activated protein kinase : MAPK, phosphatidyl inositol-3-phosphate kinase : PI3 K,...),
- la déstabilisation de l'architecture cellulaire par altération du cytosquelette,
- des lésions de l'ADN mitochondrial,
- la libération de cytokines capables de causer des lésions au niveau de l'ADN des cellules voisines (bystander effects).

En raison des dommages potentiels causés par les rayonnements ionisants sur les cellules, plusieurs systèmes de défenses antioxydants non enzymatiques (glutathion, acide L ascorbique, ...) et enzymatiques (catalases, superoxyde dismutase, ...) permettent de neutraliser les agents chimiques issus de la radiolyse de l'eau [7]. En complément de ces différents mécanismes de défenses, les cellules possèdent également des systèmes de réparation et d'élimination des molécules endommagées par les rayonnements ionisants. L'ensemble de ces processus chimiques et biochimiques retentissent sur la survie cellulaire et notamment sur son potentiel de renouvellement mitogène.

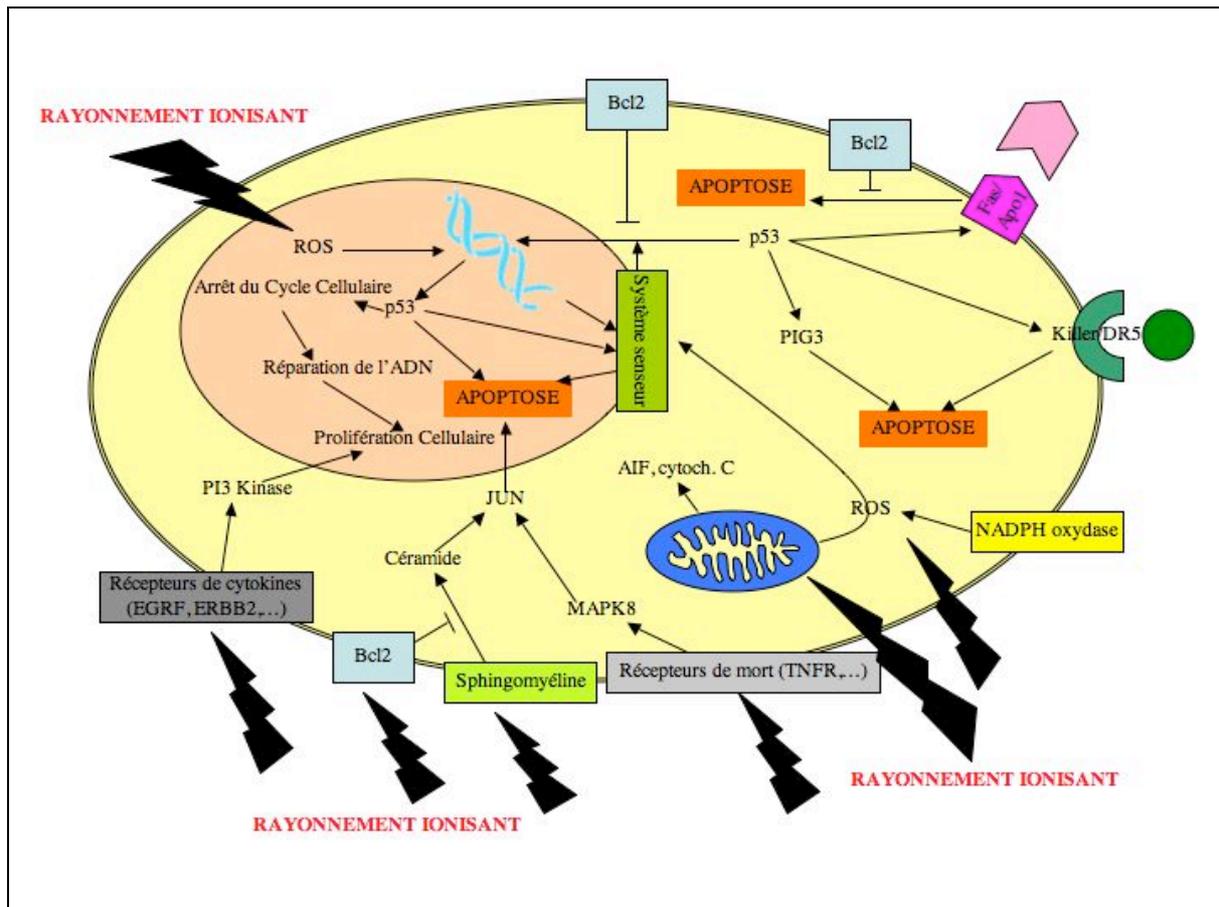


Figure n°2 : Effets des rayonnements ionisants sur une cellule et mécanismes orientant la cellule vers l'apoptose ; D'après [5]. Les dommages subis par l'ADN induisent une activation de la protéine p53 entraînant un arrêt du cycle cellulaire, une réparation de l'ADN ou une entrée en apoptose. Cette orientation est aussi sous le contrôle de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 localisée dans la membrane cellulaire, de récepteurs aux cytokines (EGFR, TNFR,...).

La division cellulaire est le processus fondamental par lequel une cellule mère donne deux cellules filles identiques entre elles et à la cellule dont elles dérivent. Lorsqu'elles ne se divisent pas, les cellules sont dites en quiescence ou aussi en phase G_0 . Sous l'effet de signaux mitogènes, elles entament un cycle de division (Figure n°3). Le cycle cellulaire est classiquement divisé en quatre phases : G_1 , S, G_2 , M [8]. Au cours de la phase G_1 (de « gap », intervalle), les cellules passent par un point de restriction, qui est un point de non-retour à partir duquel le cycle est irréversiblement engagé. La phase G_1 est préparatrice à la phase S (de « synthesis », synthèse) au cours de laquelle l'ADN est répliqué. La phase G_2 précède la phase M (de « mitosis », mitose) où les chromosomes répliqués pendant la phase S sont répartis dans les deux cellules filles. Lorsque les cellules cessent toute prolifération, sous l'effet de signaux antimitogènes ou suite à la disparition des agents mitogènes, elles quittent le cycle cellulaire et retournent en phase de quiescence. Dans le processus pathologique de cancérogenèse, la cellule perd ses capacités de régulation du cycle

cellulaire avec pour conséquence une phase G_0 inexistante et un cycle cellulaire accéléré [9].

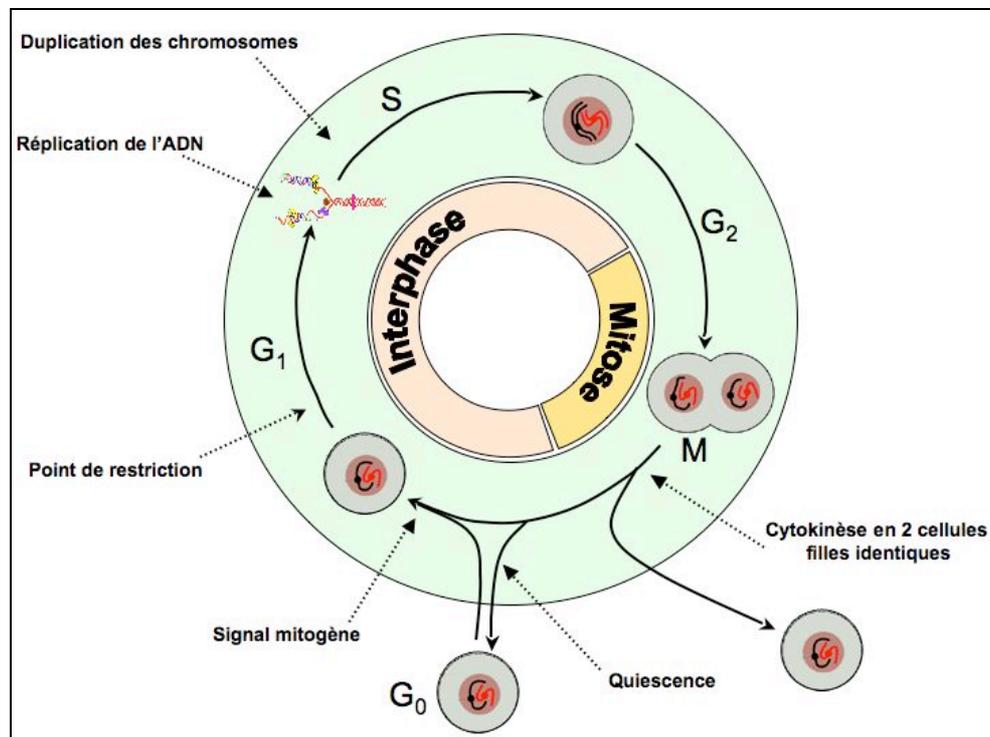


Figure n°3 : Phases et événements majeurs du cycle cellulaire.

Chacune des phases du cycle cellulaire correspond à une activité cellulaire et à une conformation de l'ADN particulière. L'enchaînement coordonné entre les différentes phases est sous la dépendance de complexes formés par l'association d'une sous-unité régulatrice de type cycline avec une sous-unité catalytique de type kinase cycline dépendante (*cyclin dependent kinase*, Cdk). Au cours du cycle cellulaire, il existe des points de contrôle (*checkpoints*) qui sont des points de décision où des mécanismes de contrôles empêchent la progression du cycle cellulaire si les étapes précédentes n'ont pas été finalisées ou si l'ADN est lésé. Ainsi, chaque phase ne peut commencer que lorsque la précédente s'est déroulée correctement

L'irradiation d'une cellule entraîne un arrêt ou un ralentissement des phases G₁/S en évitant la copie de bases endommagées, un arrêt en phase G₂ et une accumulation des cellules en phase G₂/M (permet une réparation avant que la cellule ne s'engage en mitose) [10]. Le blocage cellulaire est un mécanisme de défense de la cellule permettant à cette dernière de pouvoir réparer ses lésions (par excision re-synthèse, réparation des cassures,...) ou, lorsque les dommages sont trop importants d'orienter la cellule vers une

mort soit nécrotique (mort dite passive qui suit le passage en mitose de cellules présentant des dommages de leur ADN par cytololyse), soit apoptotique qui est une mort dite programmée par laquelle les cellules s'autodétruisent.

L'apoptose est médiée principalement par la protéine p53 qui est l'une des protéines les plus importantes dans le mécanisme de contrôle du cycle cellulaire. La protéine p53 est particulièrement induite lorsqu'il existe des dommages à l'ADN [11] et peut apparaître de façon précoce dans les heures qui suivent l'irradiation ou de façon tardive plusieurs jours après l'irradiation. Cette protéine se fixe sur des séquences régulatrices de gènes intervenant dans la réparation de l'ADN et dans l'orientation de la cellule vers une mort programmée apoptotique. La protéine p53 est particulièrement impliquée dans l'arrêt en phase G₁/S via la transactivation de la protéine p21 inhibitrice de certains complexes cycline/cdk. La protéine p53 n'est pas indispensable pour l'arrêt en phase G₂ mais sa régulation est indispensable pour le soutenir. Les fortes doses d'irradiation ont tendances à induire des morts nécrotiques alors que les faibles doses provoquent des morts cellulaires apoptotiques [5].

Malgré l'ensemble des mécanismes de défense et de réparation de la cellule, il peut subsister des lésions non-létales de l'ADN mal ou non réparées qui pourront se transmettre aux cellules filles et progressivement dégénérer (Figure n°4) menant ainsi la cellule vers un processus cancéreux par mutagenèse : dérégulation de la prolifération, immortalisation et inactivation de la voie apoptotique [12].

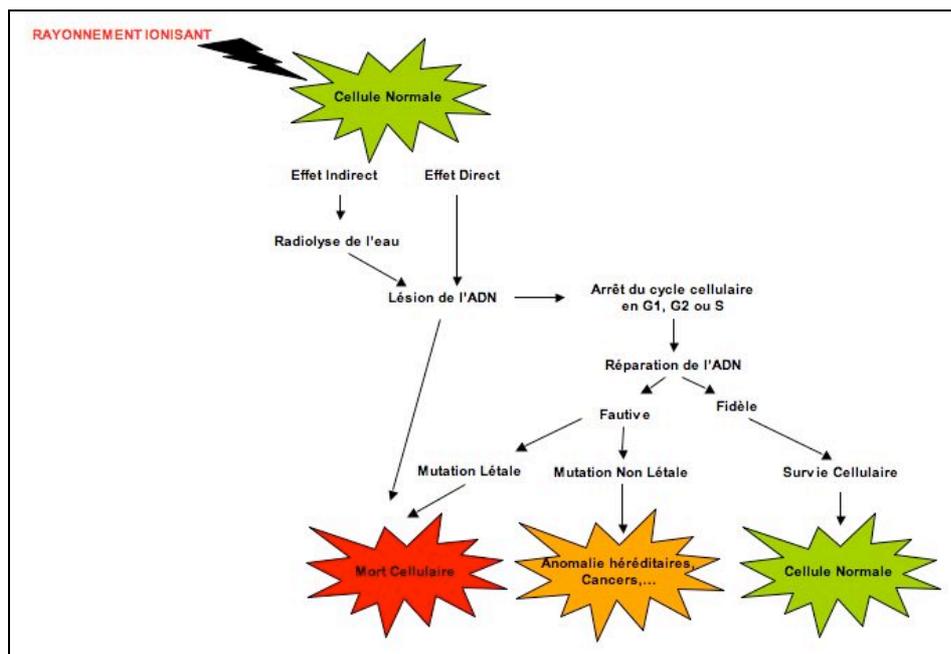


Figure n°4 : Devenir des cellules et réparations possibles après irradiation.

I.2.2. Effets tissulaires

Les tissus étant constitués de cellules, la perte cellulaire consécutive à une irradiation va entraîner certaines conséquences fonctionnelles variables selon le degré de différenciation des cellules atteintes, l'organisation tissulaire, l'indépendance des tissus dans un organe et les fonctions assurées par les tissus atteints [13].

En termes de radiobiologie, les tissus dits « compartimentaux » (renouvellement rapide et hiérarchisé) et les tissus dits « non compartimentaux » (renouvellement lent non hiérarchisé ou flexible) présentent des caractéristiques différentes vis à vis d'un rayonnement ionisant [14].

Les **tissus compartimentaux**, comme la peau, l'intestin, le tissu séminifère ou la moelle osseuse sont relativement radiosensibles. Ce type de tissu est composé d'au moins 3 compartiments de maturation cellulaire successifs, parcourus dans le temps par leur cellules constitutives :

- un compartiment de cellules souches pluripotentes (nombreuses mitoses, cellules non différenciées),
- un compartiment intermédiaire de maturation (amplification des cellules, différenciation cellulaire en cours),
- un compartiment fonctionnel (pas de mitoses, cellules différenciées).

Dans ce type de tissus, le flux cellulaire va toujours des cellules souches vers le compartiment fonctionnel. Pour des doses modérées de radiation, les cellules les plus lésées sont les cellules souches et l'expression de la lésion tissulaire s'exprimera après une période de latence correspondant au temps de transits cellulaires entre les compartiments souches et fonctionnels. L'expression pathologique de l'irradiation se fera sous la forme d'une aplasie ou d'une hypoplasie avec, dans le cas de la moelle osseuse, une neutropénie et une thrombopénie dans les quelques jours suivant l'irradiation et une anémie observée après quelques semaines. Pour une dose plus importante de radiation, les cellules du compartiment de maturation sont également atteintes et la latence d'apparition des effets est plus courte (avec une intensité des lésions plus grande). Les dommages causés par l'irradiation de ce type de tissus sont en liens avec les cellules souches atteintes (hémorragie digestive, aplasie médullaire, brûlure radiologique,...).

Les **tissus non compartimentaux**, comme les tissus hépatique, rénal ou vasculaire sont relativement radiorésistants. Ce sont des tissus pour lesquels on ne peut pas individualiser de compartiment cellulaire spécialisé dans leur propre reproduction. Le

renouvellement se fait selon les besoins par mitoses de cellules fonctionnelles. Ces tissus sont constitués de cellules à vie longue dont le taux de renouvellement reste faible. Suite à une irradiation, la différenciation et la longue durée de vie des cellules laisse le temps aux réparations de se faire par un phénomène de blocage et d'accumulation des cellules en phase G₂. Ce blocage finit par être levé grâce aux mécanismes de régulations tissulaires avec reprise tardive et simultanée des mitoses, ce qui a pour conséquence un ralentissement de l'évolution tissulaire et une reprise retardée et en phase des mitoses pouvant être abortives après quelques cycles (éventuellement quelques années après l'irradiation) à l'origine de phénomènes d'avalanches entraînant la disparition massive et simultanée d'un grand nombre de cellules avec de graves insuffisances tissulaires.

On notera également l'apparition d'une fibrose cicatricielle au niveau du tissu irradié. Cette fibrose accompagnant la cicatrisation nécessaire à la réparation du tissu lésé est de volume variable et proportionnel à la dose administrée.

Parmi les effets tissulaires des rayonnements ionisants, on distinguera [12] :

- des **effets déterministes** qui sont des effets dose-dépendant avec effet seuil. Ils sont liés à la mort cellulaire consécutive à l'irradiation des tissus compartimentaux ou non. Ces effets peuvent apparaître de façon précoce (inférieur à 6 mois) pour les tissus compartimentaux ou de façon tardive (supérieur à 6 mois) pour les tissus non-compartimentaux. La gravité de ces effets est proportionnelle à la dose reçue et la pathologie développée est caractéristique de l'irradiation.

- des **effets stochastiques** qui sont des effets non dose-dépendant de la dose reçue (sans effet seuil reconnu). Ce sont des effets à long terme (plusieurs années) qui sont liés à des transformations cellulaires viables engendrant mutations et cancérisations. Ces effets sont à caractère aléatoire (facteur de risque) de gravité indépendante à la dose reçue mais dont la fréquence de survenue dans la population exposée est proportionnelle à la dose. La pathologie développée n'est pas caractéristique de l'irradiation et il n'y a aucune différence entre un cancer radio induit et un cancer non radio induit.

I.2.3. Principes de la radiothérapie

La radiothérapie consiste à exposer les cellules cancéreuses d'une tumeur à des radiations qui empêchent la multiplication des cellules malades et entraînent leur destruction. L'idée d'utiliser des rayonnements ionisants dans le traitement de certaines pathologies cancéreuses est apparue à la fin du XIX^{ème} siècle avec l'utilisation de rayons X par Victor Despeignes à Lyon pour traiter une tumeur de l'estomac. Aujourd'hui, trois méthodes permettent d'irradier des cellules cancéreuses :

- la curiethérapie (ou brachythérapie) qui utilise des sources radioactives scellées (iridium-192, césium-137, iode-125) placées au cours d'une intervention chirurgicale au contact direct des tissus tumoraux (curiethérapie interstitielle) ou dans une cavité à proximité de la tumeur (plesiocuriethérapie),
- la radiothérapie externe, qui est la plus fréquemment utilisée, consiste à irradier la tumeur à distance à partir d'un faisceau de rayonnements ionisants issus soit d'un accélérateur linéaire (irradiation par des électrons de 8 à 30 MeV ou par des photons X de 4 à 25 MeV générés par passage des électrons précédemment accélérés à travers une plaque de tungstène), soit d'une source de cobalt-60 (photons γ de 1,25 MeV),
- la radiothérapie métabolique qui utilise des sources radioactives non scellées généralement injectables (iode-131, yttrium-90). Cette pratique, qui fait l'objet de ce travail de thèse est du ressort de la médecine nucléaire et n'appartient pas au sens courant du terme de radiothérapie qui est décrite dans ce paragraphe.

La radiothérapie est sauf exception un traitement locorégional qui, pour être efficace, c'est-à-dire capable d'éradiquer une tumeur et l'ensemble de ses extensions tout en respectant les tissus sains compris dans le volume irradié, doit être appliquée de telle sorte qu'un effet différentiel important apparaisse. Cet effet différentiel est obtenu en tirant parti des différences de comportements cellulaires et tissulaires entre la tumeur et les organes sains à épargner, dits organes critiques.

Trois types de moyens permettent d'obtenir cet effet différentiel :

- technologique avec la radiothérapie de conformation tridimensionnelle qui permet l'adaptation la plus exacte possible du volume irradié au volume tumoral (lorsque celui-ci n'est pas disséminé), excluant ainsi le plus possible de tissus sains hors du volume cible,
- radiobiologique, pour amplifier les différences de radiosensibilité entre les tissus tumoraux et les tissus sains grâce au fractionnement et à l'étalement de la radiothérapie,
- pharmacologiques, en associant soit des médicaments cytotoxiques à l'irradiation sous forme de chimio-radiothérapies concomitantes, soit en utilisant des radioprotecteurs des tissus sains.

La radiosensibilité des cellules saines ou d'origine tumorale est déterminée par la réalisation de courbes de survie après irradiation. La courbe obtenue permet de définir un modèle mathématique représentant la proportion de cellules survivantes après irradiation.

Ce modèle qui ajuste au mieux les courbes de survie de cellules de mammifères est le plus souvent un modèle linéaire quadratique d'équation [15] :

$$S = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$$

S : survie cellulaire

D : dose délivrée

α et β : coefficients semi-logarithmiques.

Cette courbe biphasique (Figure n°5) comporte un épaulement et une partie distale linéaire. Grâce à la modélisation des courbes de survie, il a ainsi été possible de formuler des hypothèses concernant la mort cellulaire après exposition aux radiations qui peut être due :

- à des lésions létales d'emblée, non réparables (représentées par la pente initiale α de la courbe de survie),
- à la non-réparation de lésions potentiellement létales (représentées par l'épaulement de la courbe et correspondant à la saturation progressive des mécanismes de réparation cellulaire), lésions considérées comme réparables si la cellule est maintenue dans des conditions retardant sa progression dans le cycle cellulaire,
- à l'accumulation de lésions sublétales non suffisantes individuellement pour entraîner la mort cellulaire (représentées par la partie linéaire distale β de la courbe de survie).

Expérimentalement, la survie cellulaire est augmentée quand une dose d'irradiation est fractionnée en deux et que l'intervalle entre les fractions est de six heures. Ce laps de temps est suffisant pour permettre la réparation des lésions sublétales, et ce phénomène de réparation est plus important pour les cellules saines que pour les cellules tumorales [2].

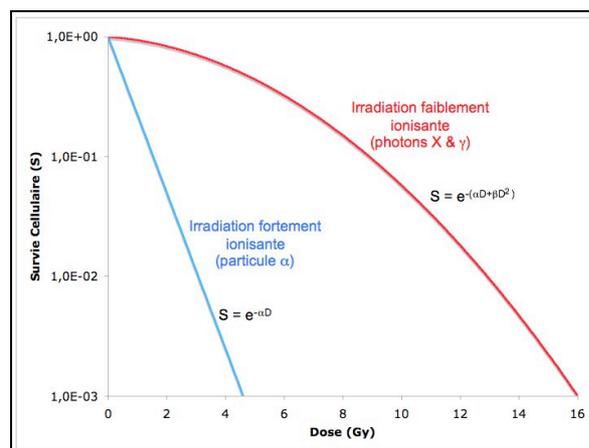


Figure n°5 : Représentation de la courbe de survie cellulaire en fonction de la dose de rayonnement ionisant (en Gray). En bleu, survie consécutive à une irradiation fortement ionisante ; en rouge, survie consécutive à une irradiation faiblement ionisante [15].

La radiosensibilité cellulaire est différente d'une lignée à l'autre, et au sein d'une même lignée, la radiosensibilité varie selon des caractéristiques cellulaires intrinsèques telles que [16]:

- la position des cellules dans le cycle cellulaire (les phases G_2 et M étant les plus radiosensibles),
- le degré d'oxygénation,
- le pH,
- la teneur en agents anti-oxydant (glutathion, super oxyde dismutase,...),
- l'efficacité des systèmes de réparation cellulaires.

Mais aussi selon les paramètres liés à l'irradiation :

- nature du rayonnement (lorsque le rayonnement est fortement ionisant, la mortalité cellulaire est plus grande car la cellule a plus de difficulté à réparer correctement les lésions induites),
- fractionnement, étalement et débit de dose (quand les cellules sont irradiées à faible débit de dose, elles peuvent réparer les lésions sublétales en cours d'irradiation, éliminant ainsi la composante β pour aboutir à une courbe de survie qui est linéaire, ne comportant qu'une seule pente α).

Comme le montre l'étude des courbes de survie cellulaire, l'efficacité de la radiothérapie est dépendante de la dose de rayonnements administrée au niveau de la tumeur. Il apparaît donc important de quantifier cette dose délivrée à la tumeur par une technique appropriée de dosimétrie.

I.2.4. Notions de dosimétrie interne en médecine nucléaire

La dosimétrie est une discipline permettant de déterminer la grandeur des dépôts d'énergie résultant de l'irradiation d'un tissu biologique. La grandeur physique utilisée est la dose absorbée qui s'exprime en Gray (Gy) et qui correspond à la quantité d'énergie déposée en Joules (J) dans une région divisée par la masse de cette région en kilogrammes (kg).

En radioprotection et en radiobiologie, la grandeur d'intérêt utilisée usuellement est la dose efficace E exprimée en Sievert (Sv) qui définit le risque global équivalent à celui d'une exposition de l'organisme entier. Le rapport 60 de la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) définit la dose efficace E comme la somme des doses équivalentes H_T reçues au niveau de tous les organes ou tissus T exposés, chacune de ces

doses étant pondérée par un facteur W_T , lié à la radiosensibilité propre du tissu ou de l'organe considéré (Tableau n°2) selon la formule : $E = \sum_T W_T \cdot H_T$

Tableau n°2 : Facteurs de pondération W_T en fonction de la radiosensibilité des tissus [17].

Organes	Facteur W_T	$\sum W_T$
Moelle rouge, Colon, Poumon, Estomac, Sein, Reste de l'organisme	0,12	0,72
Gonade	0,08	0,08
Vessie, Œsophage, Foie, Thyroïde	0,04	0,16
Os (surface), Cerveau, Glande salivaire, Peau	0,01	0,04
Total		1

Reste de l'organisme : glandes surrénales, région extra-thoracique, vésicule biliaire, cœur, reins, ganglions lymphatiques, muscles, muqueuse orale, pancréas, prostate (homme), intestin grêle, rate, thymus, utérus (femme).

La dose équivalente H_T dans un organe ou tissus T est la somme des doses absorbées dues à chaque type de rayonnement R pondérée par une facteur W_R lié à la radiotoxicité du rayonnement (Tableau n°3) suivant la formule : $H_T = \sum_R W_R \cdot D_{T,R}$

Tableau n°3 : Facteurs de pondération W_R en fonction de la nature du rayonnement [18].

Type de rayonnement	Facteur W_R	
Photons	1	
Électrons	1	
Neutrons	< 10 keV	5
	10 – 100 keV	10
	> 100 keV – 2 MeV	20
	> 2 – 20 MeV	10
	> 20 MeV	5
Protons	2	
Alpha	20	

Dans le cas particulier de la radiothérapie interne, les calculs dosimétriques dépendent à la fois des données physiques de la source radioactive mais aussi des données biologiques.

Les méthodes dosimétriques classiquement utilisées qui sont décrites dans ce paragraphe sont essentiellement basées sur des modèles mathématiques (issus d'images scintigraphiques) plus ou moins représentatifs du patient et ne permettant pas, de fait, d'obtenir une dosimétrie personnalisée. Les principales raisons de cette limitation sont que :

- le patient est représenté par un modèle mathématique standard ne tenant pas compte des variations morphologiques propre à chaque individu,
- la radioactivité est supposée répartie uniformément dans les organes sources (ou fraction d'organe source pour les techniques les plus précises),
- les doses absorbées (et donc la dosimétrie) sont uniquement calculées à l'échelle des organes ou de fractions d'organes.

Actuellement, des approches dosimétriques personnalisées par calcul Monte-Carlo sont en cours de développement. Ces techniques sont plus précises car elles prennent en compte tous les critères d'une configuration réaliste, et permettent notamment de considérer la morphologie de chaque patient. Cependant, cette méthodologie requiert un trop grand temps de calcul et est limitée par la puissance de l'informatique pour être appliquée en routine.

Les conséquences dosimétriques d'une irradiation interne sont dépendantes des caractéristiques physiques du radionucléide (période, type de particules, énergie) et biologiques du vecteur (fixation, biodistribution, cinétique d'élimination, distribution spatiale et temporelle). Afin de tenir compte de ces différents paramètres dans l'estimation de la dose absorbée moyenne (\bar{D}) reçue par une cible r_k depuis une source r_h , une méthode générale a été décrite et publiée sous le formalisme du *Medical Internal Radiation Dose (MIRD)* [19] :

$$\bar{D}_{(r_k)} = \sum_h \tilde{A}_h \cdot \frac{\sum_i \Delta_i \cdot \Phi_i(r_k \leftarrow r_h)}{m_k}$$

Cette équation tient effectivement compte des facteurs physiques et biologiques sous la forme de :

- la fraction absorbée (ϕ_i) qui est une grandeur sans dimension et qui correspond à la fraction d'énergie absorbée par le tissu par rapport à l'énergie émise par un radionucléide émettant une radiation d'énergie i ,
- l'énergie moyenne par transition nucléaire (Δ_i) exprimée en $J \cdot Bq^{-1} \cdot s^{-1}$, qui permet de tenir compte des différents types de rayonnements émis lors d'une désintégration et correspondant au produit du nombre de particules de type i émises par désintégration et de leur énergie moyenne.
- la masse de l'organe cible (m_k),
- l'activité cumulée (\tilde{A}_h) qui correspond au nombre total de désintégration survenues dans un organe dans l'intervalle de temps considéré. Cette valeur tient

compte de l'activité A_0 présente post-injection au niveau de l'organe source mais aussi de la période effective de l'isotope qui est une valeur dépendante de la période biologique T_{bio} , (variable pour chaque individu et pour chaque organe) et de la période physique T_{phys} du radionucléide suivant la formule suivante :

$$\frac{1}{T_{eff}} = \frac{1}{T_{bio}} + \frac{1}{T_{phys}}$$

En ce qui concerne la radio-immunothérapie, différents critères vont guider le choix du vecteur immunologique et du radionucléide afin d'optimiser l'impact dosimétrique sur les tissus à traiter :

- l'agent radiopharmaceutique doit atteindre rapidement la cible tumorale (moindre irradiation des tissus sains) et être faiblement éliminé après sa fixation à sa cible (augmentation de l'activité cumulée au niveau de la tumeur),
- les rapports de l'activité tumorale à l'activité des tissus non tumoraux (*tumour/non-tumour ratio*) doivent être les plus élevés possible pour minimiser l'irradiation au tissu sain,
- les cibles tumorales doivent être les plus petites possible (faible masse) pour avoir une dose absorbée plus élevée et plus homogène,
- le choix du radionucléide utilisé est dépendant du type et de l'énergie des particules émises ainsi que de sa période physique.

Malgré ces différentes caractéristiques dosimétriques permettant d'affiner la dose injectée dans le cadre de la radio-immunothérapie, les posologies rencontrées en pratique clinique sont généralement exprimées en fonction de la surface corporelle et non en fonction des résultats dosimétrique (qui sont rarement disponibles et qui ne sont que faiblement corrélés avec l'efficacité thérapeutique [20]).

I.3. Le vecteur immunologique

La réussite de la radio-immunothérapie étant notamment dépendante des propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques du vecteur immunologique utilisé il est important d'étudier les caractéristiques particulières des immunoglobines.

I.3.1. Structure et caractéristiques des immunoglobulines

Les immunoglobulines (Ig) sont des protéines potentiellement glycosylées présentes physiologiquement dans le plasma mais aussi dans les autres liquides biologiques de l'organisme comme les sécrétions. Les immunoglobulines migrent dans la zone γ à l'électrophorèse des protéines plasmatiques et sont par conséquent qualifiées de γ -globulines (Figure n°6). Ce sont, après l'albumine, les protéines les plus représentées au niveau plasmatique. Elles sont synthétisées par les plasmocytes (cellules dérivant des lymphocytes B activés) et représentent les effecteurs de l'immunité humorale sous le nom d'anticorps en étant spécifique de l'antigène qui a déclenché leurs synthèses.

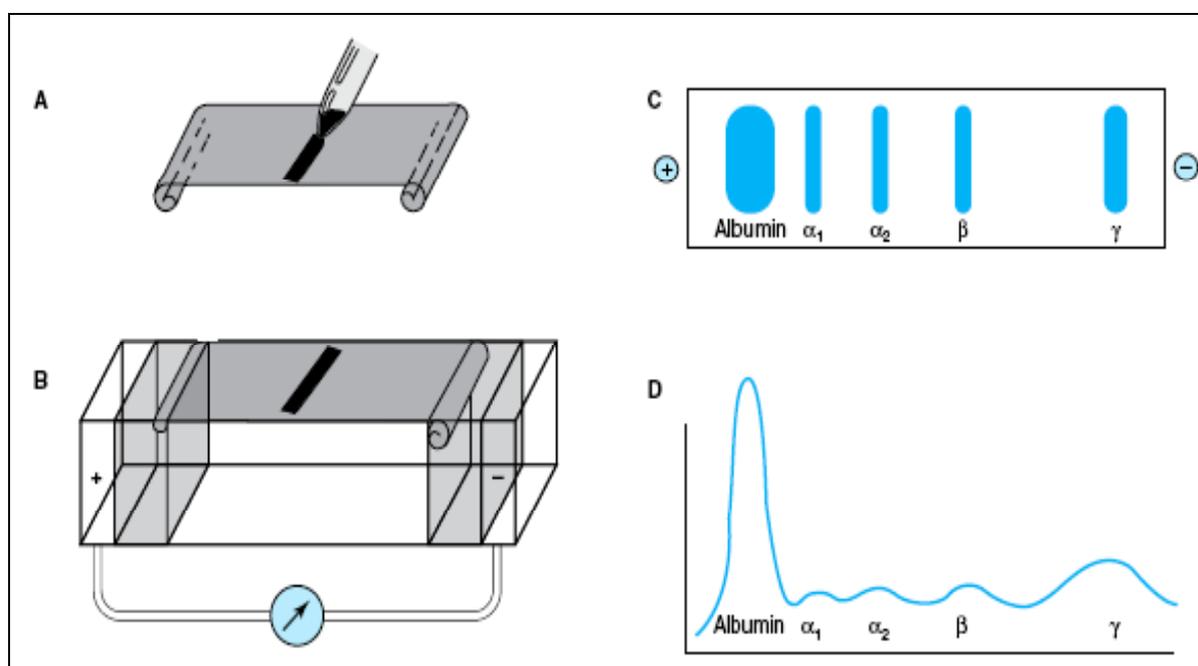


Figure 6 : Electrophorèse des protéines plasmatiques. A : Dépôt de l'échantillon sérique sur un gel d'acétate de cellulose. B : Application d'une différence de potentiel entre les deux extrémités du gel. C : Visualisation sous forme de bandes des différentes protéines constitutives de l'échantillon. D : Mesure UV des différentes bandes (albumine, α_1 -globuline, α_2 -globuline, β -globuline, et γ -globuline)[21].

Les immunoglobulines sont formées de quatre chaînes polypeptidiques (Figure n°7) : deux chaînes légères (**L** pour *light*) et deux chaînes lourdes (**H** pour *Heavy*) qui sont reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures dits « intercaténaires » assurant une flexibilité à la molécule. Pour un anticorps donné, les deux chaînes lourdes sont identiques, de même pour les deux chaînes légères (Figure n°7). Le repliement en trois dimensions de ces chaînes forme une structure en Y [22].

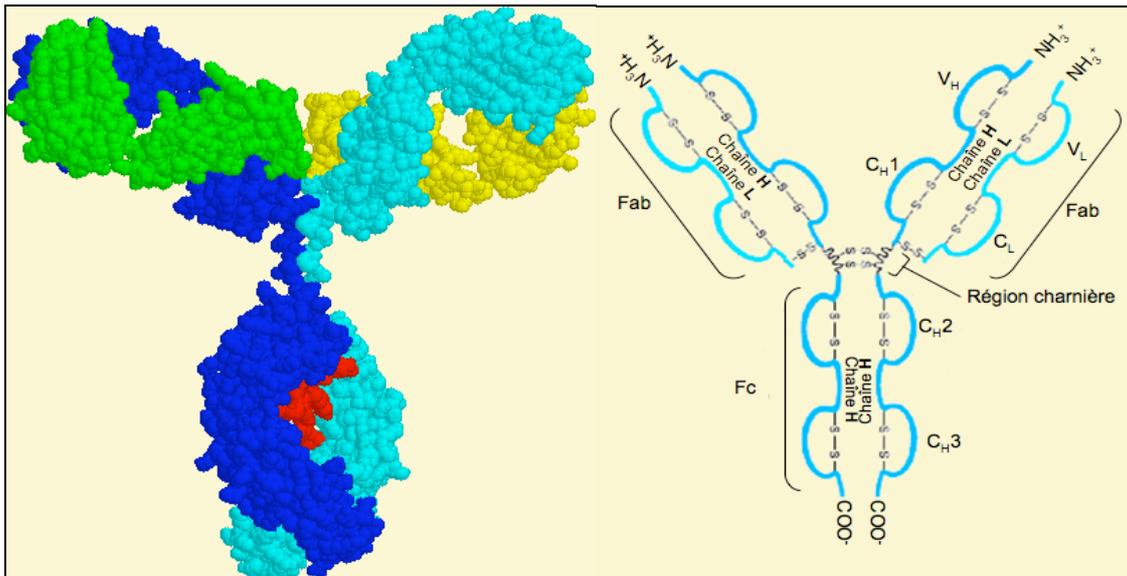


Figure n°7 : Représentation schématique d'une immunoglobuline. A gauche, représentation 3D en sphère d'une immunoglobuline. Les chaînes lourdes sont colorées en bleu et les chaînes légères en vert et jaune. La coloration rouge est attribuée aux chaînes oligosaccharidiques. A droite, représentation schématique d'une immunoglobuline avec ses deux chaînes lourdes (Chaîne H), ses deux chaînes légères (Chaîne L), ses repliements globuliniques et ses fragments Fab et Fc. (D'après [23]).

On retrouve, chez l'homme, deux types de chaînes légères : les chaînes kappa (κ) et lambda (λ). Un plasmocyte ne peut produire qu'un seul type de chaîne légère, c'est pourquoi, sur une immunoglobuline donnée, les chaînes légères sont identiques (κ ou λ). Au niveau plasmatique, environ 2/3 des immunoglobulines ont des chaînes κ et 1/3 des chaînes λ . Les chaînes légères sont composées d'environ 220 acides aminés (poids moléculaire : 25 kDa) avec une partie -COOH terminale très conservée au sein des anticorps et une partie -NH₂ terminale très variable. Les parties constantes et variables se replient grâce à des ponts disulfures intracaténaux en domaines globulaires d'environ 110 acides aminés caractéristiques de la famille des immunoglobulines (Figure n°7).

Les chaînes lourdes varient selon les différentes classes et sous-classes d'immunoglobulines : chaînes lourdes gamma (γ), alpha (α), mu (μ), delta (δ) et epsilon (ϵ) pour les IgG, IgA, IgM, IgD et IgE respectivement. Une chaîne lourde est composée d'environ 450 acides aminés (poids moléculaire : 50 kDa). Tout comme les chaînes légères, les chaînes lourdes se replient sur elles-mêmes grâce à des ponts disulfures intracaténaux en domaine globulaire de 110 acides aminés (Figure n°7). Les deux chaînes lourdes d'une immunoglobuline sont reliées entre elles à mi-distance environ des extrémités par une ou plusieurs liaisons covalentes (ponts disulfures). Cette zone dite « charnière » est constituée majoritairement de proline et de cystéine conférant ainsi à la chaîne lourde une grande flexibilité (de 0 à 180°), facilitant ainsi la liaison de l'immunoglobuline avec son antigène.

Selon la classe d'anticorps, on retrouve 3 ou 4 domaines constants notés C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} et C_{H4} situés dans la partie -COOH terminale et un domaine variable V_H situé dans la partie -NH₂ terminale. De plus, les chaînes lourdes peuvent porter sur leur partie carboxy-terminale des chaînes oligosaccharidiques (glycanes) au nombre de 1 à 7 selon la classe de l'anticorps.

Les domaines constants des chaînes lourdes ne sont pas impliqués dans la reconnaissance de l'antigène, mais interviennent dans l'activation du système du complément et dans la liaison aux cellules immunitaires. Une immunoglobuline possède quatre domaines variables, deux sur les chaînes lourdes et deux sur les chaînes légères. L'association entre un domaine variable porté par une chaîne lourde (V_H) et le domaine variable adjacent porté par une chaîne légère (V_L) constituent le site de reconnaissance (ou paratope) de l'antigène (Figure n°7). Ainsi, une molécule d'immunoglobuline possède deux sites de liaison à l'antigène. Ces deux valences sont identiques, d'où la possibilité de lier deux molécules d'antigène par anticorps (monospécifique et bivalent).

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

Les différentes sous-classes d'immunoglobulines se caractérisent par des formes polymériques de type dimère (IgA) ou pentamère (IgM) où les molécules d'immunoglobulines sont reliées par l'intermédiaire d'une glycoprotéine de 15 kDa (chaîne J ou pièce sécrétoire). Les sous-classes se distinguent également par une variabilité des régions charnières, du nombre de résidus oligosaccharidiques portés ainsi que par le nombre de domaines constants présents au niveau des chaînes lourdes (3 pour les IgG, IgD et IgA ; 4 pour les IgE et IgM).

Dans une espèce animale donnée, les classes et les sous-classes d'immunoglobulines (c'est-à-dire les différents types de chaînes lourdes et légères) présentent des caractères propres à l'espèce. Ces caractères sont dénommés isotypes et déclenchent, lorsqu'ils sont injectés à une autre espèce l'apparition d'anticorps anti-isotypes ayant pour but d'éliminer l'isotype reconnu alors comme antigène étranger. Ainsi l'injection d'anticorps murin à un être humain induit la synthèse d'anticorps anti-isotypes de souris :

HAMA (« *Human Anti-Mouse Antibodies* ») pouvant entraîner une réaction immunitaire potentiellement létale (choc anaphylactique).

Chez l'homme, on dénombre 5 isotypes différents classés en fonction de la nature des domaines constants de la chaîne lourde : γ , α , μ , δ ou ϵ (Tableau n°4).

Tableau n°4 : Propriété des différents isotypes d'immunoglobulines

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

Les allotypes correspondent à des variations génétiques entre individus, au sein d'une même espèce. Chez l'homme, toutes les différences allotypiques sont situées sur les domaines constants des chaînes lourdes et des chaînes légères. Les allotypes des immunoglobulines ont été découverts en 1956 par Grubb et Laurell sur les chaînes lourdes d'isotypes de type IgG. Au total, on dénombre vingt-quatre allotypes différents pour les chaînes IgG regroupés au sein des quatre sous-classes : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4. Les chaînes lourdes des IgA présentent quant à elles deux variations allotypiques caractérisant

les sous-classes Am1 et Am2. L'allotypie des parties constantes des chaînes légères fut découvert en 1961 par C. Ropartz *et al.* Cette allotypie ne concerne que les chaînes κ et correspond à des substitutions d'acides aminés en position 153 et 191. Ces substitutions engendrent trois spécificités différentes (Km1 à Km3).

La variabilité idiotypique est associée au site de reconnaissance antigénique d'un anticorps et implique les parties variables des chaînes lourdes et des chaînes légères. Un idiotype se définit comme un clone d'anticorps spécifiquement dirigé contre un antigène particulier. Les antigènes sont des macromolécules naturelles ou synthétiques étrangères à un organisme et reconnues par ce dernier comme appartenant au «non-soi» et entraînant une réaction immunitaire dont le but est l'élimination de l'antigène. La partie de l'antigène qui est reconnue par l'anticorps est dénommée «épitope». Les antigènes sont généralement des protéines ou des polysaccharides. Dans le cas des protéines, l'épitope correspond le plus souvent à une petite séquence d'environ 12 à 18 acides aminés (Figure n°8) qui peuvent soit se suivre de façon linéaire sur la chaîne peptidique (épitope séquentiel), soit être voisin après le repliement tridimensionnel de la protéine (épitope conformationnel). La spécificité de la reconnaissance anticorps-antigène réside dans la spécificité de la liaison épitope-paratope.

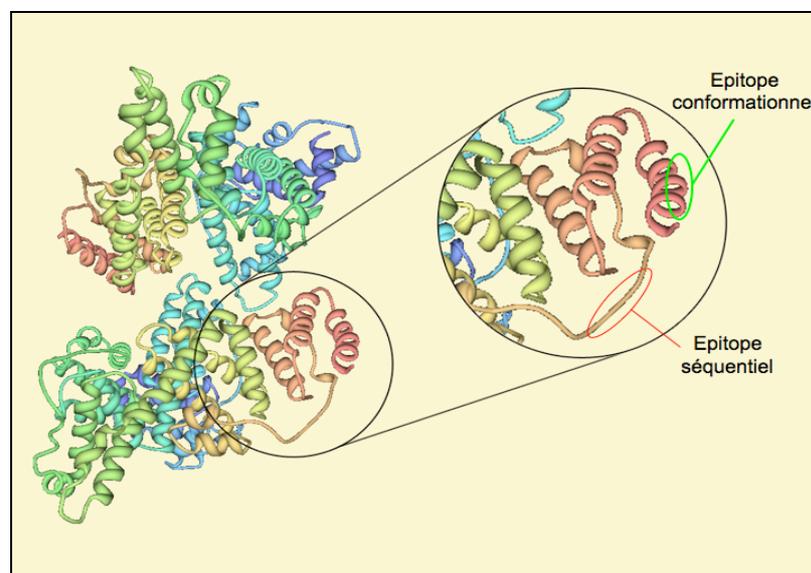
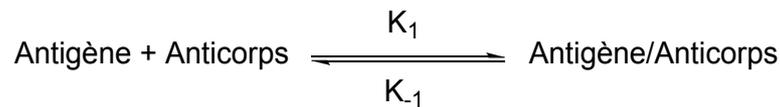


Figure n°8 : Configuration spatiale des sites épitopiques.
Représentation d'un épitope séquentiel et d'un épitope conformationnel.

Un antigène donné peut présenter plusieurs régions épitopiques différentes et être reconnu par plusieurs paratopes différents. Néanmoins, sur un même antigène, certains épitopes sont plus reconnus que d'autres, on parle alors d'épitopes immuno-dominants. il

s'agit, en général, des épitopes situés en périphérie de l'antigène car ils sont, pour des raisons d'encombrement stérique, plus facilement accessibles. De plus, il est à noter que deux antigènes différents peuvent exprimer le même épitope. Un anticorps reconnaissant le premier antigène peut donc reconnaître le deuxième antigène, on parle alors de réaction croisée.

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



K_1 : constante d'association

K_{-1} : constante de dissociation

La constante d'affinité K_a (exprimé en $L \cdot mol^{-1}$) se définit comme le rapport :

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

La constante d'affinité d'un antigène pour un anticorps varie de $10^4 L \cdot mol^{-1}$ (faible affinité) à $10^{11} L \cdot mol^{-1}$ (forte affinité). L'affinité est la somme des forces d'attractions et de répulsions qui s'établissent entre paratopes et épitopes.

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

Une molécule est dite antigénique lorsqu'elle se fixe sur un paratope et est dite immunogénique lorsqu'elle provoque ou déclenche une réaction immunitaire. Comme nous l'avons signalé, pour qu'une réaction immunitaire se déclenche, il faut que la molécule

immunogène ait une certaine dimension (12 à 18 acides aminés). Toutefois, on peut observer la formation d'anticorps avec des molécules plus petites. Dans ce cas, de telles molécules étrangères à l'organisme sont appelées haptènes. Elles sont caractérisées par un faible poids moléculaire et sont antigéniques mais pas immunogéniques. Les haptènes peuvent être des sels de métaux lourds (nickel, chrome, argent...), des molécules organiques (acide penicilloïque...), etc. L'haptène peut devenir immunogène après fixation à un porteur (« *carrier* ») de taille plus importante (une protéine le plus souvent). Dans ces conditions, on observe l'apparition d'anticorps spécifiques anti-haptène.

Les premiers anticorps utilisés en médecine ont été extraits de sérums de mammifères immunisés. Les anticorps ainsi produits étaient dirigés contre différents épitopes de l'antigène d'origine. Cette hétérogénéité dans la population d'anticorps utilisés (anticorps polyclonaux) présentaient des affinités et des spécificités variables d'une source à l'autre et les biochimistes, à la recherche d'une préparation monoclonale d'anticorps qu'ils pourraient soumettre à une analyse chimique détaillée, se sont tournés vers les protéines produites par des patients atteints de myélome multiple. Un myélome est une tumeur de la moelle osseuse qui se manifeste par une prolifération de plasmocytes. Cette pathologie dérive d'une cellule néoplasique unique et est par conséquent constituée d'un grand nombre de clones de lymphocytes identiques. Tous les anticorps produits par ce clone sont aussi identiques et sont appelés anticorps monoclonaux. Il est à noter que cette production pathologique massive d'anticorps monoclonaux, dirigés contre un antigène inconnu, est inadaptée pour des utilisations diagnostiques (immunoanalyse) ou cliniques (immunothérapie) qui requièrent une population monoclonale dirigée contre un antigène bien défini. La solution fut apportée en 1975 par Georges Köhler et César Milstein (Prix Nobel de physiologie et de médecine en 1984) [24]. Leur invention est basée sur la fusion d'un lymphocyte B particulier produisant une immunoglobuline spécifique et d'une cellule de myélome (Figure n°9). L'hybridome ainsi obtenu présente à la fois la capacité de proliférer de façon illimitée (immortalité due à la cellule de myélome) mais aussi la capacité de produire de grandes quantités d'anticorps spécifiques de l'antigène désiré (capacité due au lymphocyte B).

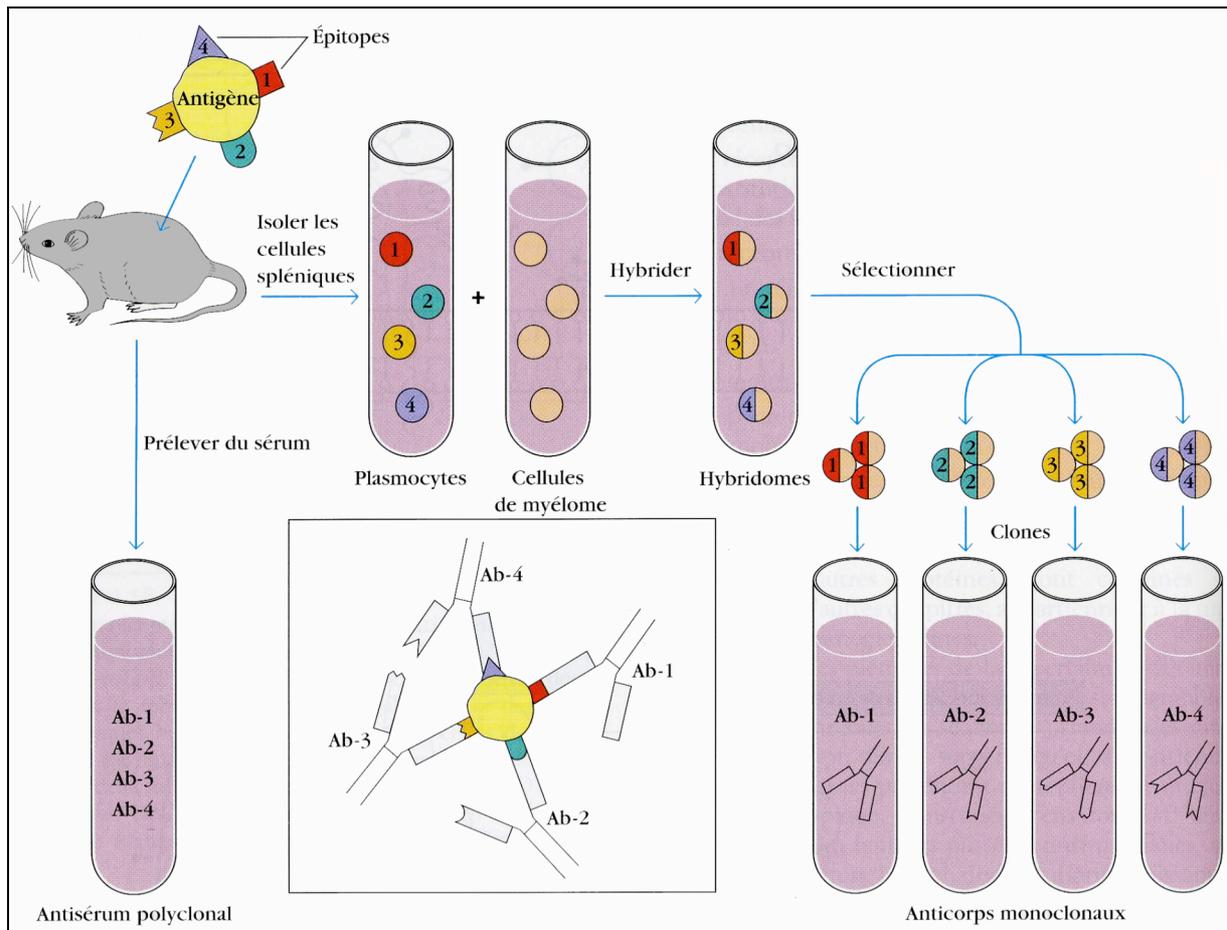


Figure n°9 : Production d'anticorps monoclonaux selon la méthode de Kohler et Milstein [25].

I.3.2. Formes d'anticorps monoclonaux utilisables en thérapie

L'affinité, la spécificité et la forme de l'anticorps monoclonal déterminent en partie sa biodistribution. L'affinité, qui doit être suffisamment importante, conditionne la solidité de la liaison antigène-anticorps et la rétention de l'immunoconjugué au niveau de la cible. Toutefois, il a été démontré dans un modèle *in vitro* de sphéroïdes multicellulaires tumoraux qu'un anticorps monoclonal de faible affinité pénètre plus profondément qu'un anticorps monoclonal de haute affinité [26]. En effet, l'anticorps monoclonal très affiné se fixe dès qu'il rencontre l'antigène et sature les sites superficiels sans qu'il y ait de diffusion. Le consensus général est néanmoins d'utiliser des anticorps monoclonaux de haute affinité afin d'améliorer le ciblage. La spécificité de l'anticorps monoclonal est également un facteur très important car il conditionne en partie la distribution dans les tissus et donc les effets secondaires.

I.3.2.1. Formes entières d'anticorps monoclonaux

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

Cette contrainte dans l'utilisation d'anticorps présentant l'isotype murin a rendu indispensable la production d'anticorps monoclonaux présentant l'isotypie humaine. La première étape dans la résolution de ce problème repose sur l'utilisation du génie génétique en biologie permettant la production d'anticorps monoclonaux chimériques homme-souris. La préparation de ces anticorps s'effectue en recombinant les séquences promotrices et codantes des régions variables d'un anticorps de souris avec les exons codants pour les régions constantes d'un anticorps humain. L'anticorps codé par ce gène recombiné est une chimère homme-souris dont la spécificité antigénique est déterminée par la région variable issue de l'ADN murin alors que l'isotypie est déterminée par la région constante issue de l'ADN humain (Figure n°10). Les immunoglobulines ainsi produites sont beaucoup moins immunogéniques que les anticorps monoclonaux de souris lorsqu'ils sont administrés à l'homme. Néanmoins, l'administration à un patient de ce type d'anticorps peut induire la synthèse d'anticorps humain anti-anticorps chimérique : HACA (*Human Anti-Chimeric Antibody*). Afin de réduire cet inconvénient il a été synthétisé des anticorps dit « humanisés » où seules les régions hypervariables CDR sont d'origine murine. Qu'ils soient chimériques ou humanisés, ces anticorps présentent l'avantage d'avoir conservés les fonctions biologiques effectrices de l'anticorps humain et sont ainsi plus susceptibles de déclencher l'activation du complément ou la liaison aux récepteurs du fragment Fc (Figure n°11).

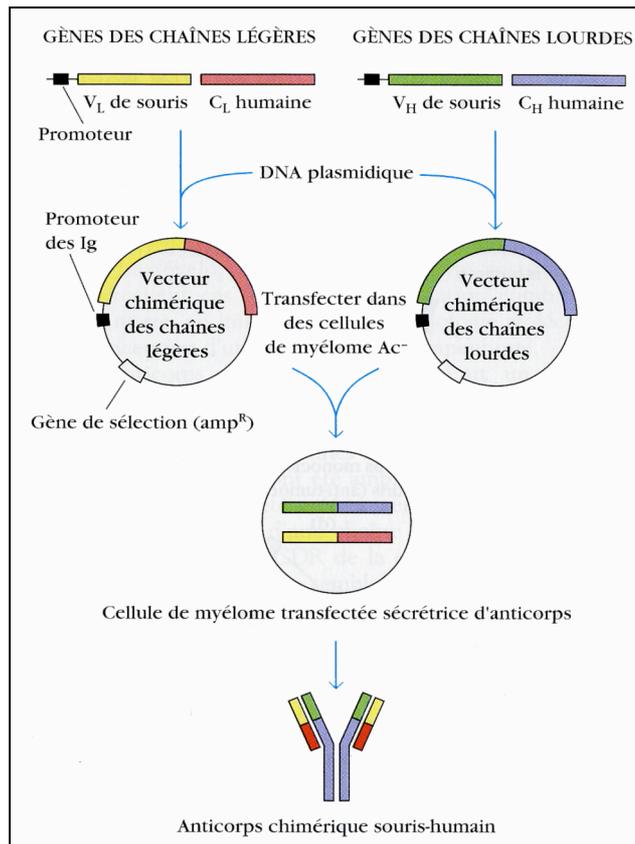


Figure n°10 : Production d'anticorps chimériques souris-humains [27].

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

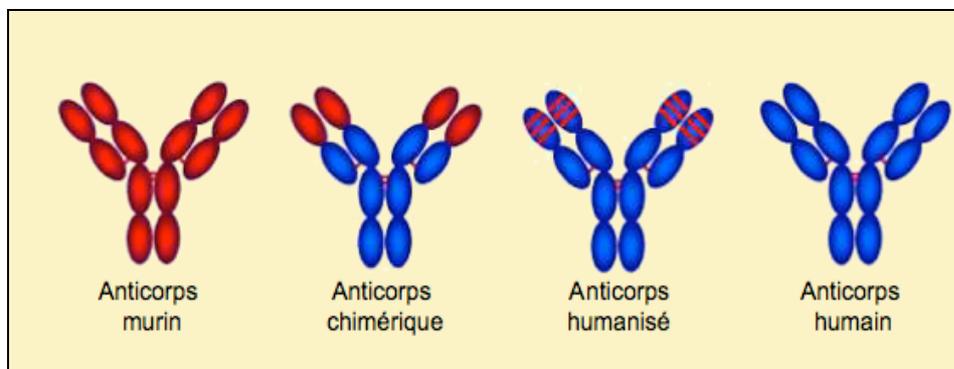


Figure n°11 : Anticorps monoclonaux modifiés [9], En rouge les parties murines, en bleu les parties humaines (les segments rouges inter-caténaires représentent les ponts disulfures reliant les chaînes légères aux chaînes lourdes ainsi que les chaînes lourdes entre-elles).

I.3.2.2. Formes fragmentées d'anticorps monoclonaux

La forme de l'anticorps monoclonal, immunoglobuline (IgG) entière ou fragmentée, modifie également son comportement dans l'organisme et son accès à la tumeur. Afin d'augmenter leurs clairances, plusieurs fragments et sous-fragments d'anticorps ont été envisagés.

Sous l'action de la papaïne, la molécule d'immunoglobuline est scindée en trois fragments : deux fragments Fab de taille similaire et un fragment Fc (Figure n°12). Les fragments Fab (pour *antigen binding*) correspondent à la moitié N-terminale du peptide. Chaque fragment Fab est constitué d'une chaîne légère et d'un fragment de chaîne lourde, les deux étant reliés par des ponts disulfures. Les fragments Fab ont la propriété de se lier spécifiquement avec un antigène déterminé. Le fragment Fc (pour *crystallisable*) correspond aux deux moitiés C-terminales des chaînes lourdes reliées par un ou plusieurs ponts disulfures. Le fragment Fc a des fonctions biologiques telles que l'activation des protéines du complément ou la fixation à certaines cellules de l'immunité (via un récepteur Fc présent à la surface) permettant ainsi une activation de ces dernières.

La pepsine coupe la molécule d'immunoglobuline en dessous du (ou des) pont(s) disulfure(s) qui relie(nt) les deux chaînes lourdes. Après action de la pepsine, on obtient un fragment de grande taille (Fab')₂ correspondant aux deux fragments Fab reliés par un ou plusieurs ponts disulfures, et de produits de dégradation du fragment Fc (Figure n°12).

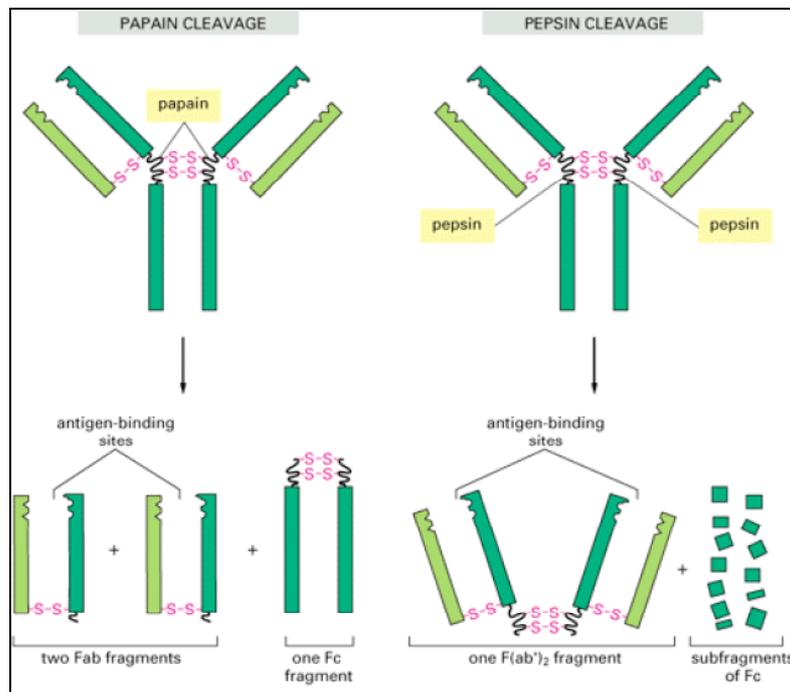


Figure n°12 : Sites de clivages d'une immunoglobuline par la papaïne et par la pepsine et différents fragments obtenus [23].

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

Enfin, les assemblages scFv et dsFv peuvent être polymérisés entre eux pour obtenir, selon le type de jonction, (Figure n°13) des fragments $(scFv)_2$, $ds(scFv)_2$, diabodies ou triabodies qui présentent l'avantage d'être di- ou tri-valents, mono- ou bi-spécifiques. Une très grande diversité d'anticorps de l'ordre de 10^{10} a été obtenue par cette méthode [28]. Cependant, cette technique ne permet pas pour le moment la production à l'échelle industrielle d'anticorps monoclonaux.

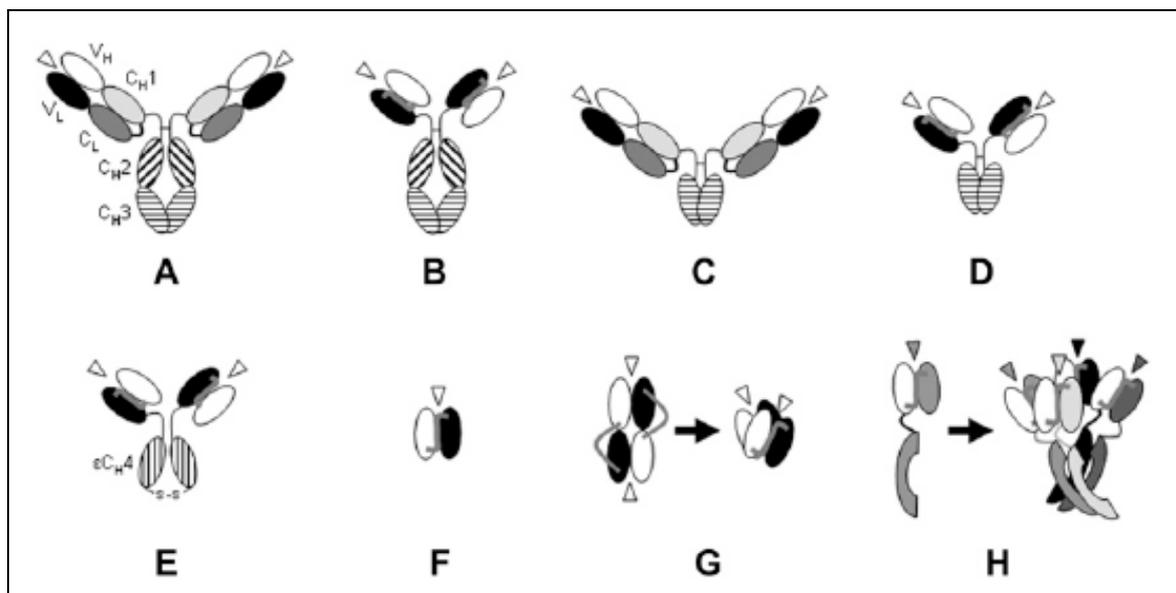
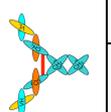
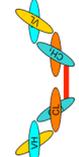
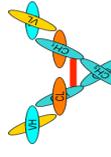


Figure n°13 : Représentation des différentes formes d'anticorps avec leurs sites de liaisons à l'antigène (marqués par une flèche blanche) [29]. A) Immunoglobuline entière. B) Fragment synthétique ScFv-Fc. C) Minibody délété en domaine CH_2 . D) Minibody ScFv- CH_3 . E) Immunoprotéine de faible masse (Small Immunoprotein ; SIP). F) ScFv (forme V_H - V_L). G) Diabody (à gauche : liaison des fragments ; à droite : forme globulaire). H) Forme tétramérique couplée à la streptavidine (à gauche : forme monomérique ScFv-streptavidine ; à droite : forme tétramérique).

Les différentes caractéristiques pharmacologiques des différentes formes d'anticorps monoclonaux (entières ou fractionnées) sont répertoriées dans le tableau n°5.

Tableau n°5 : Caractéristiques pharmacologiques des différentes formes d'anticorps

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

I.3.3. Classification des anticorps monoclonaux

Face au nombre considérable d'anticorps monoclonaux produits dans les années 1980, la nécessité de statuer sur une nomenclature internationale est apparue. Les immunohématologistes ont défini une classification qui distingue les familles d'anticorps selon leur site de reconnaissance antigénique. Cette technique de *clustering* répartit les familles d'anticorps selon une arborescence constituée de cluster de différenciation ou CD. Les CD désignent à la fois le nom de la molécule reconnue et l'ensemble des anticorps monoclonaux qui la reconnaissent.

L'apparition d'anticorps monoclonaux utilisables en thérapeutique a conduit l'OMS à statuer sur une codification terminologique des dénominations communes internationales données dans tableau n°6.

Tableau n°6 : Nomenclature internationale des anticorps monoclonaux.

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

I.4. Choix du radionucléide

Les effets de la radio-immunothérapie (RIT), comme pour toutes les formes de radiothérapie interne, dépendent des propriétés physiques, des caractéristiques chimiques et du comportement biologique du radionucléide. Ce choix est primordial et il doit également tenir compte de la disponibilité et du coût du radionucléide d'intérêt en vue d'une utilisation clinique.

La médecine nucléaire est à l'origine une technique d'imagerie médicale permettant l'étude du métabolisme de nombreux organes grâce à l'injection de radionucléides couplés à des vecteurs spécifiques des organes à étudier. Dans le cas des examens scintigraphiques, les isotopes utilisés sont des émetteurs de photons gamma (ex : technétium-99m) qui ont un très long parcours dans la matière et déposent relativement peu d'énergie par unité de distance dans le corps du patient. Leur transfert d'énergie linéique (TEL) est considéré comme faible et la majorité des rayonnements sort du corps du patient pour être détectée par une γ -caméra conduisant à une faible dose délivrée aux tissus sains. Pour la technique d'imagerie par tomographie d'émission de positons (TEP), les isotopes utilisés sont des émetteurs de positons (ex : fluor-18). Les positons (β^+) s'annihilent en présence d'électrons et l'on observe la formation de deux photons énergétiques. Ces photons présentent un TEL relativement faible et ils sortent du corps du patient afin d'être détectés. La dosimétrie est en général plus défavorable que celle obtenue au cours d'examens de scintigraphie classiques car les photons émis sont plus énergétiques (511 keV contre 140 keV pour le ^{99m}Tc).

Les applications thérapeutiques de la médecine nucléaire utilisent des isotopes radioactifs émetteurs de particules (α , β^- , électrons Auger). Ce type de particules présente un TEL élevé et toute l'énergie est déposée dans un faible volume. La dosimétrie est élevée dans ce volume restreint et l'on observe par conséquent d'importants dommages cellulaires.

I.4.1. Critères physiques

Suivant les caractéristiques physiques du radionucléide sélectionné, le choix le plus adapté s'effectue sur des paramètres comme la demi-vie, le type d'émission, l'énergie du rayonnement ainsi que la stabilité chimique du couplage entre le radionucléide et le vecteur.

I.4.1.1. Demi-vie du radionucléide

L'utilisation de vecteurs radiomarqués en médecine nucléaire a permis de délivrer des rayonnements ionisants à des cibles spécifiques. La dose efficace engagée pour la tumeur va dépendre notamment de la période physique du radionucléide puisque de ce

paramètre va dépendre l'activité cumulée. En radio-immunothérapie, cette dernière doit être en relation avec la cinétique de biodistribution, de fixation et de rétention du vecteur utilisé. Une période physique trop courte entraînera un nombre élevé de désintégrations à l'extérieur de la cible, avant que le vecteur radiomarqué n'ait atteint sa cible. À l'inverse, une période physique trop longue engendrera un grand nombre de désintégration pendant la phase d'élimination du vecteur ainsi qu'une faible activité spécifique [30]. En pratique, une période physique supérieure à la demi-vie de distribution mais inférieure à la demi-vie d'élimination du vecteur semble appropriée.

I.4.1.2. Type d'émission

En radiothérapie métabolique on va chercher à utiliser des rayonnements ionisants à TEL fort de façon à créer un maximum de lésions létales ou sublétales sur la cible. Parmi les isotopes présentant ces caractéristiques, on retrouve les émetteurs de particules β^- , d'électrons Auger ou de particules α . Bien que beaucoup de radionucléides potentiellement intéressants pour la RIT aient été envisagés (Tableau n°7), très peu sont utilisés à ce jour, car il faut tenir compte de leurs disponibilités et de leurs coûts.

Les émetteurs de particules α qui font le sujet de ce travail de thèse seront traités de façon spécifique dans la seconde partie de ce mémoire.

Les émetteurs d'électrons Auger, qui sont émis lors d'une désintégration par capture électronique ou à l'issue d'une conversion interne, présentent un transfert d'énergie linéique élevé sur les premiers nanomètres de leurs trajectoires. Ils peuvent donc engendrer une radiotoxicité importante lorsque ces éléments sont internalisés au sein même de la molécule d'ADN, ce qui n'est généralement pas le cas pour un anticorps. À distance du point d'émission, les émetteurs Auger ont un TEL faible. Plusieurs émetteurs de ce type ont été utilisés pour la radiothérapie vectorisée, notamment l'iode-125, l'indium-111 ou le gallium-67.

Les émetteurs de particules β^- qui provoquent de nombreuses lésions biologiques sur des volumes faibles ont été les premiers utilisés en RIT. Parmi les différents émetteurs β^- existants (Tableau n°7), les émetteurs de β^- de haute énergie (2 MeV) comme l'yttrium-90 ou le rhénium-188 sont susceptibles de délivrer des doses radiotoxiques aux cellules situées à moins d'une dizaine de millimètres du lieu d'émission et ainsi d'irradier de petits nodules alors que les émetteurs β^- de plus faible énergie (de 500 keV à 1 MeV) comme l'iode-131 ou le samarium-153 permettent une irradiation plus adaptée de tumeurs dont la taille varie de 0,5 à 1 mm.

Tableau n°7 : Radionucléide émetteurs β^- à potentiel thérapeutique.

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

Les émetteurs de particules β^- présentent un spectre d'émission énergétique continu et on distinguera une énergie maximale et une énergie moyenne déterminant des distances moyennes et maximales parcourues dans les tissus qui sont des paramètres importants au niveau dosimétrique. En effet, la dosimétrie délivrée à la tumeur est fonction de la localisation du point d'émission de la particule β^- par rapport à la cellule cancéreuse à détruire. Dans tous les cas, la distance moyenne parcourue est supérieure à la taille d'une cellule ce qui permet d'envisager la destruction d'une cellule non ciblée par le vecteur du fait des émissions provenant de cellules adjacentes (Figure n°14). Ce phénomène dit de « feux croisés » permet d'améliorer l'efficacité d'un traitement puisqu'il n'est pas nécessaire de cibler l'ensemble des cellules à détruire, mais qu'il suffit de cibler un nombre suffisant de cellules dans la zone à détruire. Les émetteurs de particules β^- , et notamment l'iode-131 et l'yttrium-90, sont actuellement les seuls isotopes utilisés en routine de façon clinique.

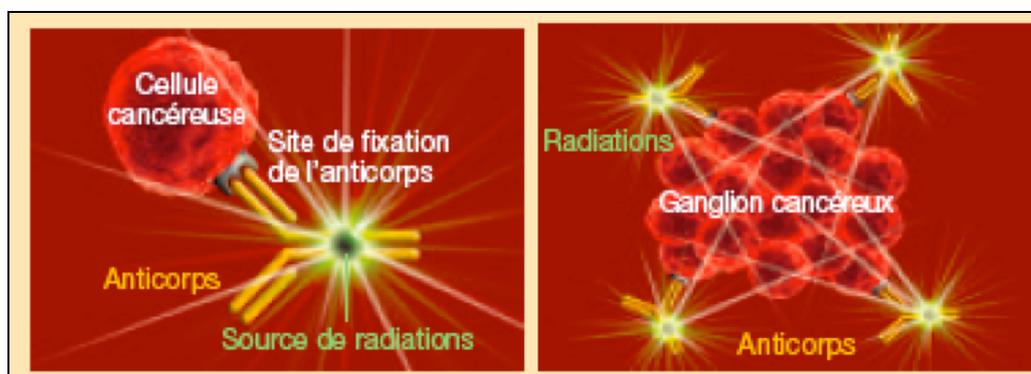


Figure n°14 : Irradiation d'une cellule cancéreuse par un anticorps radiomarqué. A droite, irradiation directe de la cellule. A gauche, irradiation indirecte et mécanisme dit de « feux croisés » [31].

I.4.2. Modalités de couplage

La plupart des radionucléides ne possèdent pas de tropisme particulier pour un tissu tumoral. Pour leur utilisation en radio-immunothérapie, les radionucléides doivent être facilement couplés au vecteur immunologique. L'association stable peut se faire directement sur la structure protéique du vecteur ou de façon indirecte par l'intermédiaire d'une molécule organique bi-fonctionnelle (Figure n°15). La liaison entre le radionucléide et le vecteur doit être la plus stable possible *in vivo* afin de limiter la libération du radionucléide à distance de la tumeur ciblée par le vecteur (libération pouvant faire suite au métabolisme physiologique du vecteur, à une instabilité chimique, à la radiolyse consécutive à une désintégration radioactive à proximité du vecteur,...). Cette étude de la stabilité de marquage sera donc un facteur prépondérant dans le développement de la radiothérapie métabolique et il sera très important de la développer pour chaque radionucléide et pour chaque technique de marquage. De plus, ce radiomarquage ne doit pas influencer sur les propriétés pharmacocinétiques et pharmacologiques du vecteur (immunoréactivité). Au final, il faut rechercher la possibilité d'une technique de marquage simple, efficace, reproductible et permettant d'obtenir l'activité spécifique la plus forte possible ainsi que la plus grande stabilité *in vitro* et *in vivo* du radioimmunoconjugué.

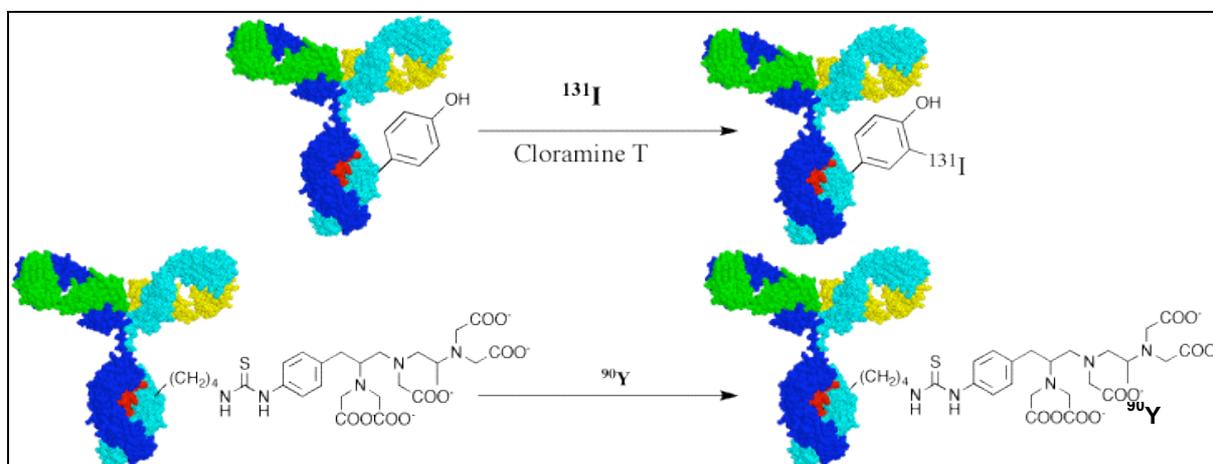


Figure n°15 : Couplage direct et indirect d'un radionucléide à une structure protéique. En haut, couplage direct d'iode-131 à un résidu tyrosine protéique. En bas, couplage indirect d'yttrium-90 à une structure protéique via un agent complexant de type MX-DTPA.

I.4.3. Modes de production

Les caractéristiques liées à la production déterminent la disponibilité, à un coût raisonnable, d'activités importantes de radionucléides. Il est à noter que le choix d'un mode

de production sera également orienté afin d'obtenir une activité spécifique du radionucléide (MBq/mg) maximale.

Les radionucléides utilisables en médecine sont produits suivants l'une des voies suivantes :

- **La capture de neutrons thermiques.** Cette réaction se déroule dans des réacteurs à neutrons où l'on place un élément cible afin d'obtenir par réaction neutronique un radioélément d'intérêt (ex : $^{185}\text{Re}(n,\gamma)^{186}\text{Re}$; $^{67}\text{Zn}(n,p)^{67}\text{Cu}$;...). Dans le cas des réactions (n,p) et (n, α), le radionucléide produit est différent de l'élément cible et peut être obtenu après purification avec une très haute activité spécifique. Dans le cas des réactions (n, γ), le radionucléide obtenu est un isotope de celui constituant la cible et, par conséquent, il est impossible à séparer chimiquement de ce dernier. Les activités spécifiques obtenues après ce type de réaction nucléaire sont en général faibles (présence d'entraîneur) sauf lorsque les sections efficaces d'interactions sont fortes ($^{176}\text{Lu}(n,\gamma)^{177}\text{Lu}$).

- **La fission d'isotopes lourds par induction neutronique.** Comme dans le cas précédant, la réaction se déroule dans un réacteur à neutron où l'on place un isotope lourd qui par fission nucléaire sous l'effet de neutrons donnera un radionucléide d'intérêt (ex : $^{235}\text{U}(n,f)^{236}\text{U} \rightarrow ^{131}\text{I} + ^{90}\text{Sr}(^{90}\text{Y}) + ^{99}\text{Mo} + \dots$).

- **Le bombardement par des particules chargées.** Les cyclotrons sont des accélérateurs circulaires de particules chargées (protons, alphas, deutons, lithium,...) qui permettent de bombarder un élément cible pour le transmuter en radionucléide d'intérêt (ex : $^{112}\text{Cd}(p,2n)^{111}\text{In}$; $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$;...). Dans certains cas, on peut produire un éclatement du noyau cible (spallation) sous tir cyclotron produisant ainsi, par un mécanisme de fission des noyaux cibles.

- **Par décroissance depuis un isotope père.** Dans ce cas, l'isotope père est produit par l'une des 3 voies précédentes puis il est conditionné sous forme de générateur. Cette voie d'obtention est une très bonne alternative pour la mise à disposition d'isotopes à demi-vie très courte puisque l'isotope père présente des caractéristiques physiques compatibles avec une logistique de distribution. La production par générateur via une élution présente l'avantage d'une grande disponibilité avec en général une activité spécifique élevée (ex : $^{99}\text{Mo} \rightarrow ^{99\text{m}}\text{Tc}$; $^{68}\text{Ge} \rightarrow ^{68}\text{Ga}$; ...).

I.5. Caractéristiques tumorales

I.5.1. Nature de la cible tumorale

Différents paramètres concernant la nature de la tumeur vont conditionner la réponse clinique à l'irradiation. L'efficacité thérapeutique dépend directement de la capacité de l'immunoconjugué utilisé en radio-immunothérapie à atteindre sa cible en quantité suffisante. Au terme de son trajet vasculaire, l'immunoconjugué doit traverser la paroi d'un capillaire et être distribué dans le compartiment interstitiel avant d'atteindre finalement les cellules tumorales.

Au cours de son développement, la tumeur présente des besoins métaboliques importants, qui pour être satisfaits requièrent l'apparition d'une néovascularisation (angiogenèse) présentant des caractéristiques différentes de la vascularisation irriguant les tissus physiologiques. Le taux de prolifération tumoral étant plus important dans les tumeurs solides que la néo-angiogenèse, on observe une réduction de la densité vasculaire au centre de la tumeur laissant apparaître des cellules distantes de plus de 100 μm du vaisseau sanguin le plus proche [32]. Cette distance relativement grande ajoutée à la pression exercée par la tumeur sur les vaisseaux [33] expliquent l'apparition d'une zone hypoxique et nécrotique au centre de la tumeur (Figure n°16). De plus, la néovascularisation tumorale est hétérogène et se développe de façon anarchique avec la présence de capillaires fenestrés, non fenestrés et discontinus, de vaisseaux sans revêtement endothélial, de bourgeons capillaires et de shunts artério-veineux [32]. Au total, à la différence des vaisseaux normaux, les vaisseaux tumoraux sont dilatés, sacculaires, tortueux et peuvent contenir des cellules tumorales dans leur revêtement endothélial (Figure n°17). L'espace vasculaire des tumeurs varie de 1 à 20 % en fonction du type et de la taille de la tumeur. Dans cet espace vasculaire désorganisé, le flux sanguin est en moyenne diminué par rapport aux tissus normaux et cette diminution peut varier exponentiellement avec l'augmentation de la taille des tumeurs. Toutefois, les flux sont très hétérogènes avec une zone nécrotique au centre de la masse tumorale qui est peu vascularisée et une zone bien vascularisée en périphérie où le flux sanguin est même plus élevé que dans les tissus normaux adjacents à la tumeur. Au niveau microscopique, on retrouve la même hétérogénéité avec un flux sanguin intermittent avec des périodes de flux ralenti voire arrêté et des périodes de reprise d'un flux significatif parfois de direction opposée. Il apparaît ainsi que le flux sanguin hétérogène contribue à une distribution elle-même hétérogène de macromolécules telles que celles d'anticorps.

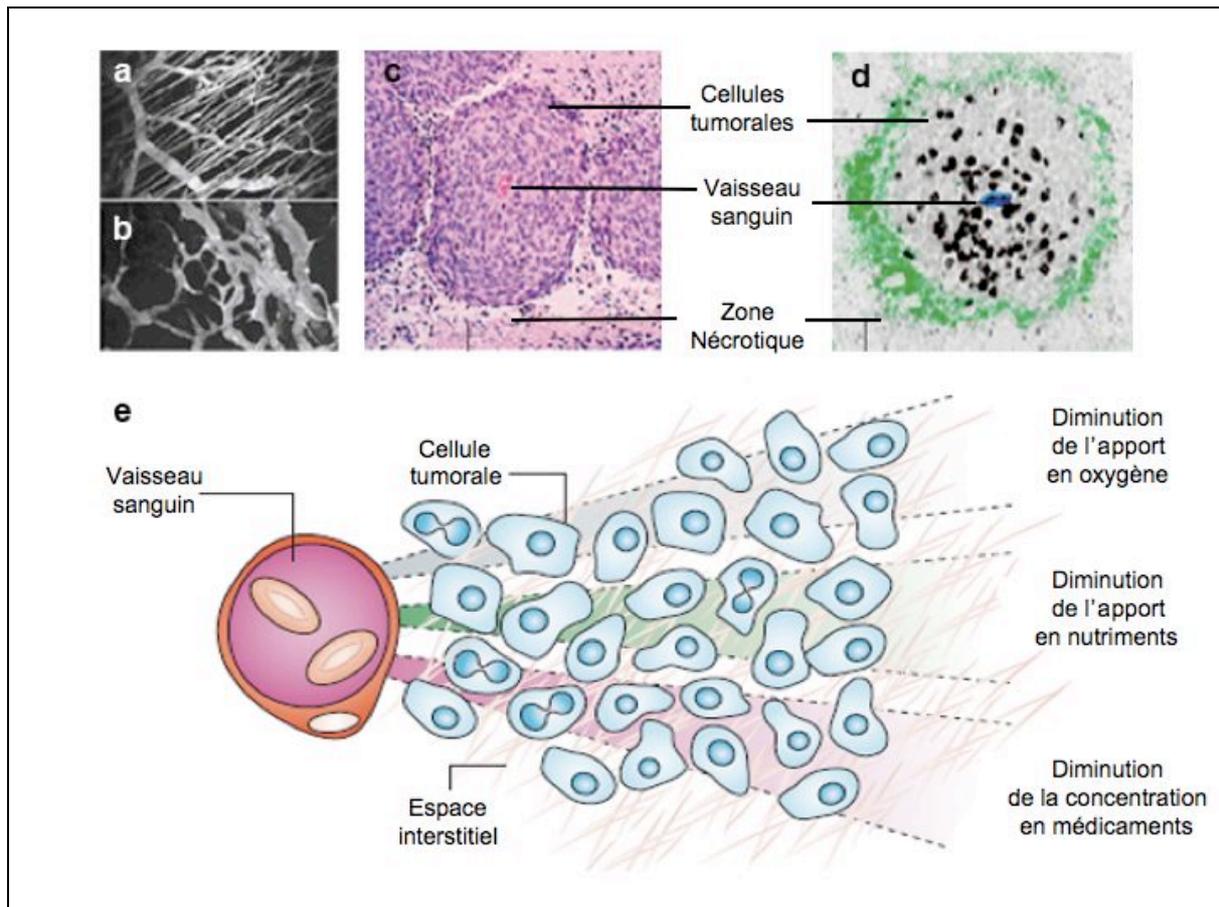


Figure n°16 : Physiologie vasculaire d'une tumeur, nécrose et diffusion médicamenteuse. a) Organisation vasculaire normale. b) Organisation chaotique tumorale. c) Cellules de cancer du col utérin xenogreffées entourant un vaisseau sanguin. d) Cellules de cancer du colon xenogreffées entourant un vaisseau sanguin. e) Schéma représentant les gradients en oxygène, en nutriments, en énergie et en médicaments au niveau tumoral [34, 35].

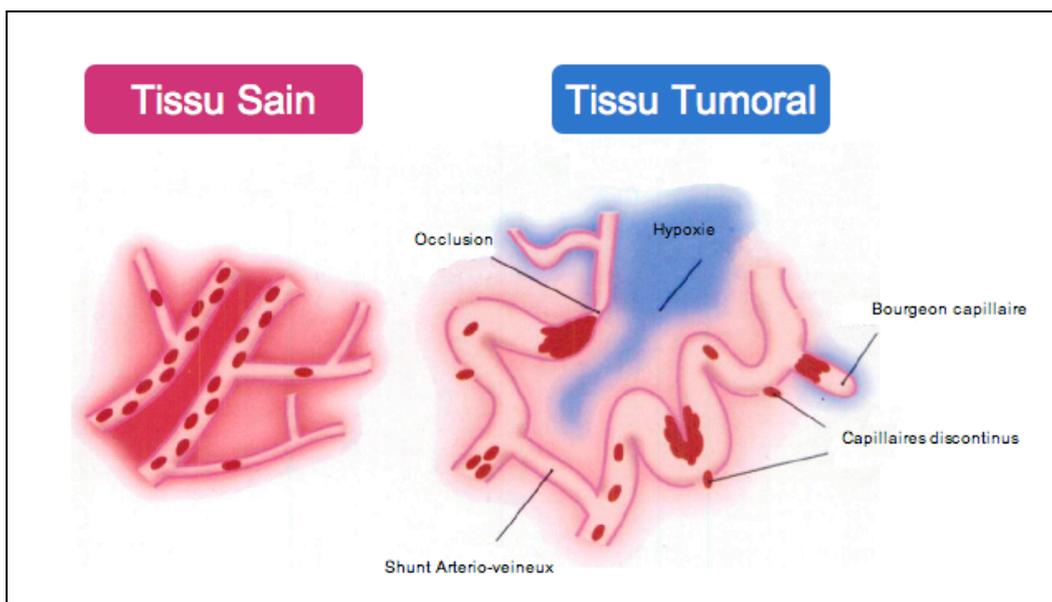


Figure n°17 : Caractéristiques pathologiques de la vascularisation tumorale [36].

Avant d'atteindre son site d'action, le radioimmunoconjugué doit traverser la paroi vasculaire. Cette étape d'extravasation s'effectue dans le cas d'une protéine de type immunoglobuline suivant un mécanisme de diffusion (minoritaire) ou de convection (majoritaire). L'extravasation par diffusion qui suit la loi de Fick est proportionnelle à la surface d'échange du capillaire et à la différence de concentration en radioimmunoconjugué entre le milieu plasmatique et le milieu interstitiel. Du fait de la structure des vaisseaux tumoraux avec l'absence de membrane basale et la présence d'espace nombreux entre les cellules endothéliales, on observe un coefficient de diffusion habituellement grand. La convection est le mécanisme prépondérant d'extravasation des molécules d'anticorps à travers la paroi des vaisseaux [37]. Elle dépend du débit d'extravasation du plasma du vaisseau vers le compartiment interstitiel. Ce débit est lui même proportionnel à la surface d'échange du capillaire et à la différence entre d'une part la différence de pression hydrostatique entre vaisseau et le compartiment interstitiel et d'autre part la différence de pression osmotique entre les deux compartiments. Il a été démontré que la pression interstitielle dans les tumeurs est supérieure à celle des tissus normaux et qu'elle est plus faible à la périphérie où elle se rapproche des valeurs des tissus normaux (phénomène expliqué par l'absence de vaisseaux lymphatiques fonctionnels au niveau tumoral [38]). Au total, on observe une diminution de l'extravasation du plasma et donc des molécules de radioimmunoconjugués par rapport aux tissus physiologiques.

On peut augmenter le passage transmembranaire des anticorps par utilisation d'agents physiques (chaleur) ou chimiques (médicaments vasoactifs) qui augmentent, au moins transitoirement, le flux sanguin et la perméabilité vasculaire de la tumeur. D'autres approches, comme l'utilisation de hyaluronidase ou de *Tumor Necrosis Factor (TNF)* peuvent permettre de diminuer la pression interstitielle dans la tumeur et ainsi d'améliorer la distribution locale du vecteur. Le transport interstitiel des macromolécules de radioimmunoconjugués peut également être amélioré en diminuant leurs tailles et en utilisant des fragments tels que $F(ab)_2$ et Fab' .

D'autre part, dans le cas de la thérapie, l'efficacité dépend de la radiosensibilité de la tumeur qui est directement liée aux capacités intrinsèques de la cellule à réparer les dommages causés par un rayonnement ionisant. En effet, il existe une corrélation entre la vitesse de croissance de la tumeur et la résistance à l'irradiation. Ainsi, les métastases à croissance rapide sont plus sensibles à l'irradiation que les métastases à croissance lente. De plus, chaque type de cellules diffère quant à son potentiel de réparation de lésions potentiellement létales ou sublétales radio-induites. Il s'avère que la radiosensibilité intrinsèque varie entre les différents types histologiques mais aussi au cours de la

croissance tumorale. Ainsi, par exemple, le neuroblastome ou le cancer du poumon à petites cellules sont réputés très radiosensibles alors que les cancers coliques sont relativement radorésistants. Il est à noter que la zone centrale nécrotique de la tumeur est hypoxique et par conséquent plus radorésistante. Enfin, l'utilisation de vecteurs radiomarqués à visée thérapeutique peut permettre, malgré une mauvaise pénétration, d'irradier le microenvironnement tumoral et ainsi d'induire une apoptose tumorale par effet de voisinage « bystander effect » (sécrétion de cytokines) en privant la tumeur de son tissu de soutien (néo-vascularisation par exemple).

I.5.2. Nature de l'antigène tumoral

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

Les premiers antigènes tumoraux ont été définis chez certains patients atteints de cancers chez qui on a retrouvé des anticorps ou des lymphocytes T reconnaissant spécifiquement ces antigènes. Il est à noter que la plupart du temps, la réponse immunitaire physiologique anti-tumorale d'un individu est insuffisante pour lutter efficacement contre la multiplication tumorale. En effet, issues d'un clone cellulaire appartenant au « soi », les cellules tumorales sont peu antigéniques, et ne sont par conséquent que faiblement immunogènes.

Les différents antigènes exprimés au niveau tumoral sont généralement classés en cinq catégories [39] :

- **Les antigènes mutés et d'expression aberrante spécifiques de tumeurs** : Ces antigènes incluent des protéines mutées ou des protéines issues d'un changement de cadre de lecture d'un gène normal. Ces antigènes ne sont pas exprimés par les cellules normales et sont par conséquent très intéressants en termes de spécificité. Ces mutations étant de nature aléatoire, elles créent le plus fréquemment des mutations uniques, spécifiques d'un patient, et de fait non exploitables en clinique. Néanmoins dans quelques rares cas, certaines mutations apparaissent fréquemment dans certains cancers au niveau de résidus particuliers et les antigènes exprimés sont retrouvés chez une grande proportion de patient comme l'antigène K-ras dans les adénocarcinomes du pancréas.

- **Groupe des « Cancer-testis antigen »** : Le nom de ces antigènes provient de leur expression restreinte aux cellules germinales testiculaires. Cependant certaines cellules tumorales, suite à des phénomènes de démethylation, sont capables de les exprimer [40]. Les antigènes de la famille MAGE (*Melanoma Antigen Family*) ont été les premiers antigènes de cette catégorie identifiés chez des patients atteints de mélanomes.

- **Les antigènes surexprimés** : Ils sont issus de protéines exprimées à un niveau de base (souvent faible) dans les cellules normales, mais surexprimées par certains types tumoraux. Parmi les antigènes surexprimés ciblés en clinique, on retrouve par exemple la glycoprotéine CD20 surexprimée sur les cellules de lymphomes malins non-Hodgkiniens, l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) exprimés dans certains cancers colo-rectaux, ou des antigènes épithéliaux comme la protéine mucine-1 (MUC1) dans certains carcinomes. Le ciblage en radio-immunothérapie de ces antigènes souvent ubiquitaire, peut être à l'origine d'un risque important d'irradiation des tissus sains.

- **Les antigènes de différenciation** : Ils sont issus de protéines intervenant dans la différenciation cellulaire, par conséquent ils sont exprimés par les cellules saines et les cellules tumorales de la même lignée histologique. L'utilisation en radio-immunothérapie de ces antigènes ne peut être envisagée que si les cellules saines exprimant cet antigène ne sont pas vitales. Ce type d'antigène a été mis en évidence dans les mélanomes et les mélanocytes.

- **Les antigènes viraux** : représentent une dernière catégorie intéressante d'antigènes tumoraux dans le cas où la transformation tumorale de certains tissus peut être causée par des virus. C'est le cas pour le carcinome du col utérin (papillomavirus), le lymphome de Burkitt (Virus d'Epstein-Barr) ou certains lymphomes T (virus HTLV-1). Les cellules tumorales portent à leur surface des molécules HLA chargées de peptides antigéniques codés par le génome viral. Ces antigènes peuvent être ciblés en radio-immunothérapie chez des patients porteurs de ce type de tumeur.

La radio-immunothérapie peut, en plus des antigènes directement exprimés par la cellule tumorale, cibler des antigènes présents dans le microenvironnement tumoral nécessaire au développement néoplasique. Parmi ceux-ci, on peut citer à ce titre l'exemple du *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)* responsable de la néo-vascularisation tumorale [41].

Enfin, une augmentation de l'expression antigénique (et donc de la fixation tumorale du radio-immunoconjugué) est possible grâce à l'utilisation de certaines cytokines (ex : association interférons alpha ($INF\alpha$) et gamma ($INF\gamma$) dans des modèles de carcinomes ovariens [42]). L'intérêt de cette augmentation de l'expression antigénique doit cependant être mis en rapport avec la pénétration intra-tumorale de l'immunoglobuline par une trop

grande fixation périphérique à l'antigène (concept de barrière antigénique développé par Weinstein à la fin des années 1980 [43, 44]).

I.6. Utilisations cliniques de la RIT

Si l'on tient compte des considérations radiobiologiques, dosimétriques ainsi que de l'hétérogénéité de la distribution pharmacologique de l'immunovecteur qui est dépendante de la taille, de la nature et de la vascularisation tumorale ainsi que de la variabilité de l'expression de l'antigène cible, on comprend que la cible type de la RIT est une tumeur accessible, radiosensible et de petite taille. Les tumeurs hématologiques sont des pathologies regroupant l'ensemble de ces critères et ont été par conséquent les premières pathologies ciblées avec efficacité par la RIT.

Les hémopathies malignes, et en particulier les lymphomes malins non hodgkiniens (LMNH), sont des tumeurs radiosensibles se présentant sous la forme de petits groupes de cellules dans la circulation générale exprimant des antigènes caractéristiques et sont par conséquent une cible préférentielle pour la RIT. Aux États-Unis, la *Food & Drug Administration* (FDA) a donné son accord en 2003 pour la mise sur le marché d'un anticorps de type IgG2a d'origine murine dirigé contre une phosphoprotéine située à la surface des lymphocytes : le CD20. L'utilisation de cet anticorps, le tositumomab (Bexxar[®]), associé au même anticorps marqué de façon directe à l'iode-131, a donné lors des études cliniques des résultats satisfaisants (Tableau n°8) par rapport à la simple chimiothérapie (réponse globale dans 28% des cas) dans les formes réfractaires et résistantes de LMNH.

Tableau n°8 : Efficacité du traitement au Bexxar[®] chez des patients présentant un lymphome malin non-Hodgkinien réfractaire/récidivant après chimiothérapie (en situation non myeloablative) [45].

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

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

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

Le Zevalin® (ibritumomab tiuxetan) est un anticorps d'origine murine marqué à l'yttrium-90 dirigé contre la protéine CD20 ayant obtenu l'AMM en France en 2004. Cet anticorps est utilisé en association d'un anticorps non radiomarqué (rituximab : Mabthera®) dirigé contre la même cible antigénique que le Bexxar® (l'antigène CD20). Cette association présente une supériorité thérapeutique avec des taux de réponses cliniques de 80% par rapport au rituximab seul qui présente des taux de réponses de 56% (Tableau n°9) [46].

Les deux spécialités présentées ci-dessus requièrent l'utilisation préalable d'anticorps froid (quelques heures avant) dirigés contre la même cible antigénique que leur homologue radiomarqué afin de saturer les sites de liaisons périphériques et donc d'optimiser la fixation tumorale de l'anticorps radiomarqué.

L'utilisation du Zevalin® est actuellement en cours d'évaluation dans le traitement des récurrences de lymphomes de bas grade, les lymphomes folliculaires et les lymphomes à cellules B [48-50].

Tableau n°9 : Efficacité du traitement au Zevalin® comparé au traitement immunothérapeutique Rituximab chez des patients présentant un lymphome malin non-Hodgkinien [47]. *Etude n°1 : Etude à groupe unique portant sur 54 patients atteints de lymphome folliculaire récidivant réfractaire au traitement par le rituximab. Etude n°2 : Etude multicentrique randomisée et contrôlée, comparant le traitement par Zevalin au traitement par rituximab chez 143 patients atteints d'un lymphome malin non-hodgkinien de faible grade ou folliculaire, récidivant ou réfractaire, ou en transformation.*

	Etude n°1	Etude n°2	
	Schéma de traitement Zevalin (n=54)	Schéma de traitement Zevalin (n=73)	Rituximab (n=70)
Taux de réponse globale (%)	74	80	56
Taux de réponse complète (%)	15	30	16
Taux de réponse complètes non confirmées (%)	0	4	4
Durée de la réponse médiane (mois)	6,4	13,9	11,8
[Extrêmes]^{1,2}	[0,5-24,9]	[1,0-30,1]	[1,2-24,5]
Delai jusqu'à la progression de la maladie médian (mois) [Extrêmes]^{1,3}	6,8 [1,1-25,9]	11,2 [0,8-31,5]	10,1 [0,7-26,1]

¹ Estimation, avec les extrêmes enregistrés.

² Durée de la réponse : intervalle entre le début de la réponse et la progression de la maladie.

³ Délai jusqu'à la progression de la maladie : intervalle entre la première perfusion et la progression de la maladie.

Parmi les anticorps radiomarqués qui font actuellement l'objet d'évaluation clinique, on peut citer l'epratuzumab (hLL2), marqué à l'yttrium-90 qui est dirigé contre la protéine CD22, antigène surexprimé dans les lymphomes malins non-Hodgkiniens de bas grade et la leucémie lymphoïde aigue (LLA) [51, 52], et l'anticorps B-B4 spécifique du syndécan 1 (CD138) marqué à l'iode-131 qui est dirigé contre un heparan sulfate exprimé sur les cellules tumorales de la totalité des patients atteints de myélome multiple [53].

Si les premiers résultats cliniques de la RIT β^- qui concernent les tumeurs hématologiques et en particulier les lymphomes malins non-Hodgkiniens ont été établis, les résultats sont nettement moins nets pour les tumeurs solides et l'intérêt de la RIT β^- dans ce cadre a été démontré pour la première fois dans le cancer médullaire de la thyroïde [54]. D'autres pathologies tumorales exprimant certains antigènes comme le CEA (*Carcinoembryogenic antigens* dans les carcinomes hépatiques ou coliques), le CAIX (*Carbonic anhydrase IX* dans certains carcinome rénal) ou le PMSA (*Prostate-specific-membrane antigens* dans les adénocarcinomes prostatiques) présentent des caractéristiques intéressantes en vue d'indication potentielle de la RIT et sont actuellement en cours d'évaluation clinique [55].

La relative radiorésistance des tumeurs solides impose des doses tumoricides élevées et injectées de façon précoce lorsque le volume tumoral est encore restreint. Néanmoins des résultats encourageants ont été apportés par différentes techniques d'optimisation de la radio-immunothérapie.

I.7. Optimisation de la RIT

L'ensemble des voies d'optimisation de la radio-immunothérapie a pour but commun d'augmenter la dose délivrée à la tumeur en amplifiant l'activité cumulée et en même temps ne pas augmenter voire réduire la dose délivrée aux organes sains. En fonction de la cible tumorale, il est possible de faire varier différents facteurs en modulant des paramètres propres à la physiologie tumorale ou au vecteur immunologique employé.

Au niveau de la physiologie tumorale, comme nous l'avons vu au niveau des caractéristiques tumorales, il est possible d'augmenter l'expression antigénique par injection de cytokine ou d'augmenter la perfusion tumorale par injection de drogues vasoactives. En pratique, l'utilisation de ce type de méthodologie est assez complexe et l'efficacité semble assez difficile à confirmer [42].

Les paramètres d'optimisation de la radio-immunothérapie liés au vecteur sont plus faciles à mettre en place et leurs effets sont quantifiables. Les différentes composantes modifiables concernent le vecteur immunologique lui-même ou le radionucléide.

I.7.1. Amélioration sur le vecteur immunologique

Comme nous l'avons vu au niveau de la physiologie tumorale, d'une part, plus le vecteur présente une faible masse moléculaire, plus il pénétrera en profondeur dans la masse tumorale et d'autre part plus l'affinité du vecteur est forte, plus il sera retenu. Lorsque l'on utilise des fragments d'immunoglobuline ($F(ab')_2$ et Fab) on observe à la fois une diminution de la masse et de l'affinité. L'expérience clinique réalisée dans le cadre des hémopathies malignes démontre que l'utilisation d'une immunoglobuline entière est adaptée dans le cadre des tumeurs petites et facile d'accès. Dans le cas des tumeurs solides de taille plus importante, il a été mis au point différentes techniques multi-temps utilisant de petites molécules à forte pénétration tumorale.

I.7.1.1. Stratégie basée sur l'affinité Avidine-Biotine

Afin de minimiser l'irradiation des tissus sains, il est possible d'utiliser la forte affinité qui existe entre la biotine et l'avidine. Pour ce faire, le patient reçoit dans un premier temps une injection avec un anticorps spécifique de l'antigène tumoral préalablement couplé à une molécule de biotine (Figure n°18). Après un délai suffisant long pour permettre l'élimination de l'anticorps non lié à la tumeur, le patient reçoit dans un deuxième temps une injection d'avidine qui est tétravalente vis-à-vis de la biotine. Dans un troisième temps, le patient reçoit une injection de biotine radiomarquée qui se fixera au complexe antigène-anticorps-biotine-avidine. De par son faible poids moléculaire, la biotine radiomarquée présente une meilleure pénétration intratumorale qu'un anticorps radiomarqué ainsi qu'une clairance plus rapide ce qui aboutit à une irradiation moindre des tissus sains [56, 57].

Une autre technique basée sur la forte affinité entre l'avidine et la biotine en 3 temps peut être utilisée. Dans un premier temps, l'anticorps spécifique de la tumeur couplé à de la streptavidine est injecté au patient suivi 24 à 48 heures plus tard, d'une chasse (*clearing*) du conjugué par un agent biotinylé ayant la propriété d'être rapidement capté par les cellules hépatiques et, en 3^{ème} étape, d'une injection de biotine radiomarquée qui se lie rapidement aux molécules de streptavidine localisées dans la tumeur [58, 59].

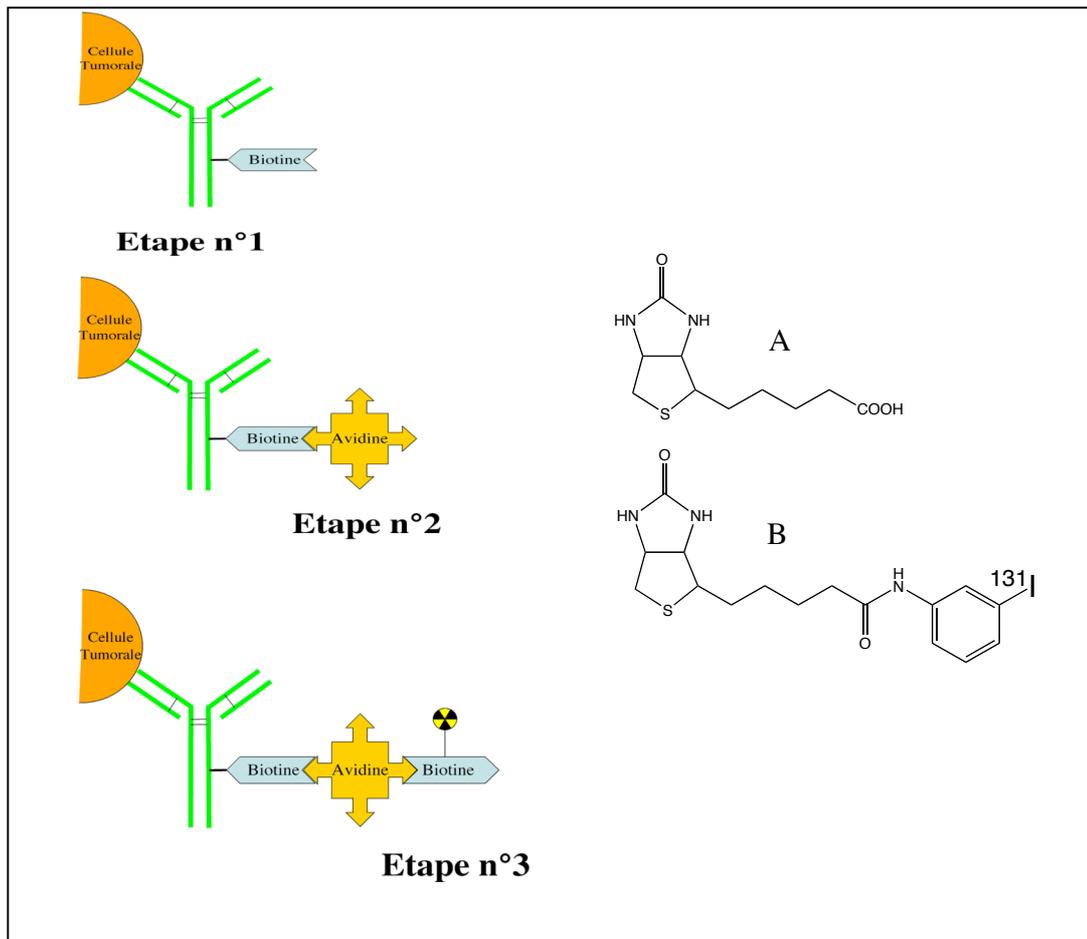


Figure n°18 : Système 3 temps reposant sur l'affinité Avidine-Biotine. A) molécule de biotine. B) molécule de biotine radio-marquée à l'iode-131.

1.7.1.2. Stratégie Affinity Enhancement System

Les progrès en immunochimie ont permis de synthétiser des anticorps présentant la caractéristique d'avoir deux paratopes spécifiques de 2 antigènes différents. Ces anticorps, dits « bispécifiques », sont des hybrides de 2 molécules obtenus soit par pontage chimique de 2 immunoglobulines différentes soit par fusion de 2 hybridomes issus de 2 lignées cellulaires différentes. L'utilisation de ce type d'hétéroconjugué bispécifique en radio-immunothérapie permet d'optimiser le ciblage tumoral par rapport aux tissus sains en injectant dans un premier temps l'anticorps bi-spécifique (Figure n°19) dont un paratope reconnaît l'antigène tumoral et l'autre un haptène connu. Après un laps de temps suffisant (quelques jours) pour que l'anticorps non fixé à la tumeur soit éliminé, on injecte dans un second temps l'haptène d'intérêt radiomarqué qui se fixera à la cellule tumorale via l'anticorps bi-spécifique. Cette technique d'*Affinity Enhancement System* (AES) a permis de démontrer une efficacité de la radio-immunothérapie dans des tumeurs solides comme le cancer médullaire de la thyroïde (CMT qui exprime fortement l'antigène carcino-

embryonnaire (ACE). Dans ce cas, un anticorps bi-spécifique anti-ACE anti-DTPA-In est injecté. Après un délai de 5 jours, suffisant pour que l'anticorps se soit fixé à la tumeur et que l'anticorps non fixé soit éliminé de la circulation générale, l'haptène di-DTPA-TL-In marqué à l'iode 131 (Figure n°20) est injecté et se dirige rapidement vers sa cible. L'haptène utilisé présente la caractéristique d'être bivalent ce qui permet un pontage entre deux anticorps prélocalisés ce qui augmente d'autant plus la stabilité du complexe [60]. Les premiers résultats obtenus dans le cancer médullaire de la thyroïde sont très prometteurs avec une augmentation de la survie accompagnée d'une diminution des marqueurs biologiques de la maladie. Il n'est pas observé de rémission complète de la maladie mais uniquement une diminution dans la progression de la pathologie. Au final, on observe un effet positif en termes de réduction de l'irradiation des tissus sains, donc de la toxicité hématologique [61, 62].

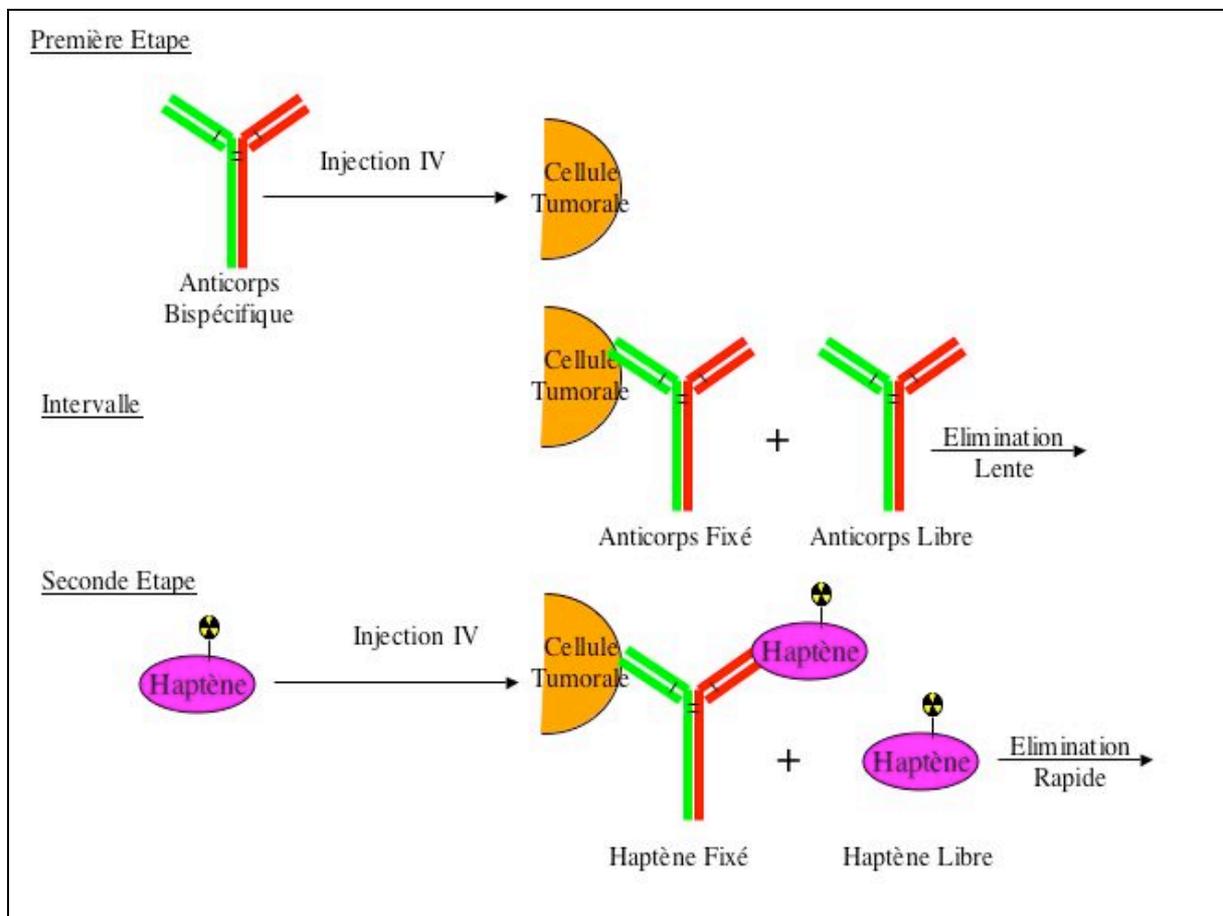


Figure n°19 : Stratégie en 2 temps dit « Affinity Enhancement System » avec utilisation d'un anticorps bispécifique et d'un haptène radiomarqué.

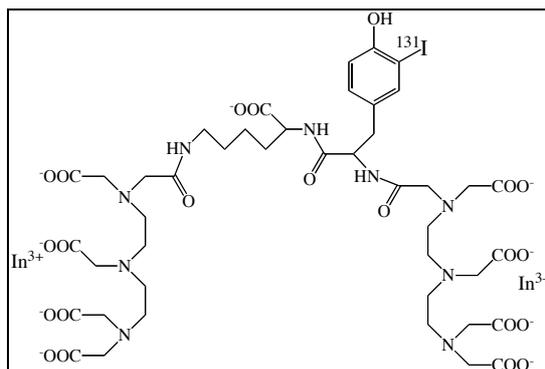


Figure n°20 : Haptène di-DTPA-TL-In marqué à l'iode-131.

I.7.2. Optimisation de l'activité spécifique et du radionucléide

Avec la plupart des radionucléides utilisés en radio-immunothérapie (yttrium-90, cuivre-67, iode-131, etc.) les activités spécifiques sont de l'ordre de 400 MBq/mg (soit environ un anticorps radiomarqué sur 100) et ce malgré le fait que les anticorps soient modifiés avec 2 à 4 ligands par molécule. Ce rapport entre le nombre de vecteurs radiomarqués et le nombre de vecteurs « froids » (qui se lie également à l'antigène) n'étant pas un facteur favorisant de la RIT, l'idée est venue de fixer plusieurs isotopes sur le même anticorps et d'augmenter ainsi l'activité spécifique du radiopharmaceutique.

En théorie il est possible d'augmenter l'activité spécifique (démonstré avec du bismuth-213 où l'on a atteint 4GBq/mg) mais au-delà d'une trop grande activité spécifique on observe des problèmes de stabilité liés à la radiolyse. Une méthode utilisant des anticorps couplés à des liposomes radiomarqués portant plusieurs atomes radioactifs (éloignement du site radioactif pour minimiser la radiolyse sur l'anticorps) est actuellement en cours d'évaluation au Centre de Recherche en Cancerologie Nantes-Angers (CRCNA - INSERM U892). Dans cette stratégie, l'anticorps (vecteur) est couplé à un liposome ou à une nanoparticule [63] portant à sa surface et en son centre (partie polaire) des molécules auxquelles sont fixées des radio-isotopes [64].

La dosimétrie et les effets biologiques relatifs (EBR) étant d'autant plus importants que le TEL est élevé (Figure n°21), l'idée d'utiliser des isotopes émetteurs de particules α est apparue [4]. Les isotopes émetteurs de particules α (ex : astate-211) présentent la caractéristique d'émettre des particules volumineuses (noyaux d'hélium) plus énergétiques et parcourant moins de distance que les particules β^- .

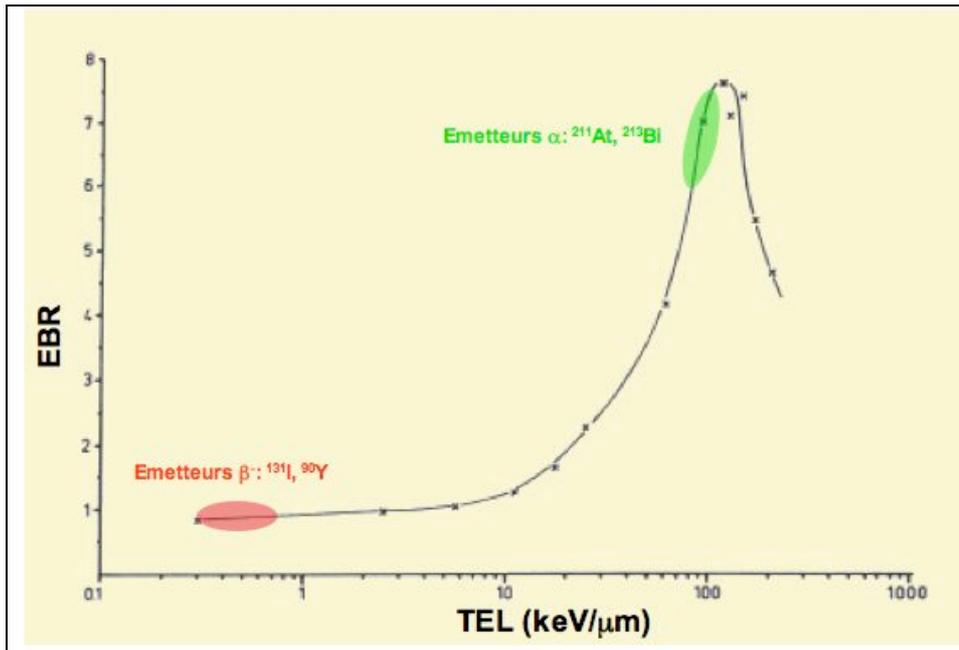


Figure n°21 : Evolution des effets biologiques relatifs (EBR) en fonction du transfert d'énergie linéique (d'après [65]).

Les rayonnements consécutifs à une désintégration β^- ont un TEL de l'ordre du keV/ μm ce qui est relativement faible et provoque une faible densité d'ionisation tout au long de leur parcours qui est de quelques millimètres dans les tissus mous. Il est à noter que les particules β^- présentent un fort TEL sur les derniers micromètres du parcours (pic de Bragg). L'une des voies d'optimisation de la radio-immunothérapie consiste à utiliser des émetteurs de particules α qui présentent un rayon d'action court (de l'ordre de la centaine de micromètres) avec un TEL allant d'environ 40 à 100 keV/ μm (Figure n°22).

Cette stratégie d'optimisation de la radio-immunothérapie qui constitue le travail de cette thèse semble donc plus adaptée au traitement de cancers diffus présentant de petites tailles comme les leucémies ou le myélome multiple ainsi que pour le traitement des micrométastases et de la maladie résiduelle (Figure n°23). Le fort potentiel radiotoxique des particules α permet également d'envisager de cibler des antigènes tumoraux faiblement exprimés.

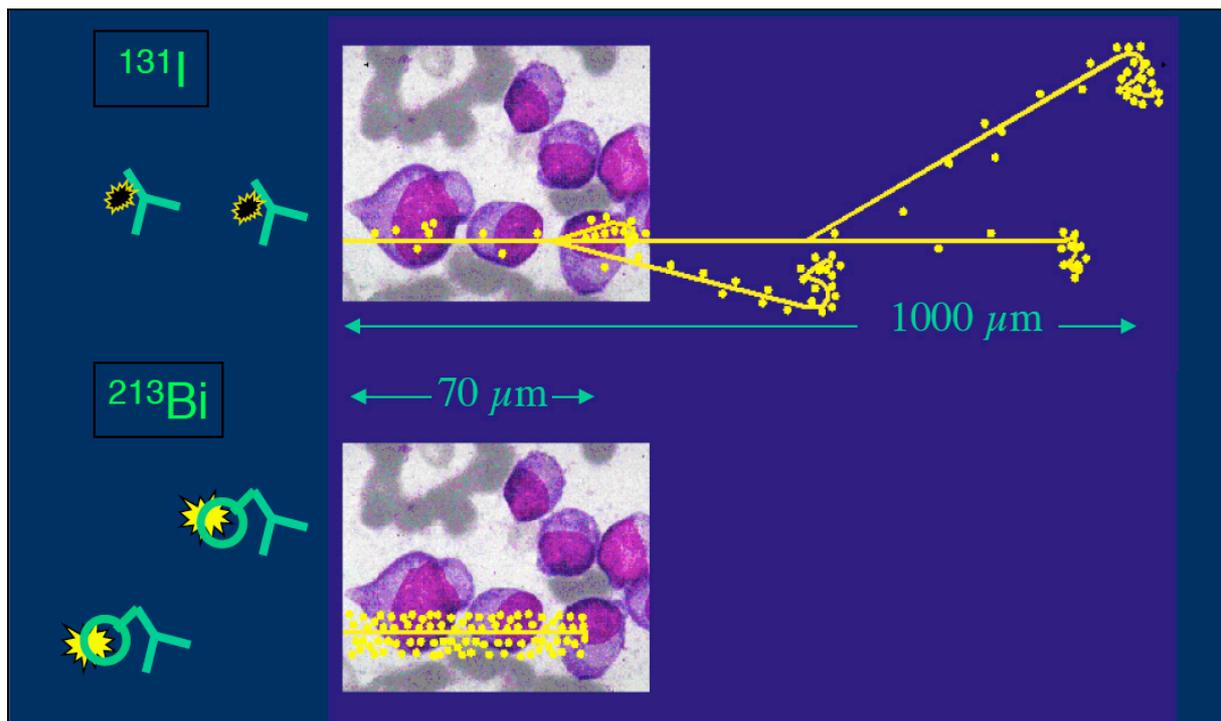


Figure n°22 : Différence de trajet et de densité d'ionisation entre l'iode-131 (émetteur β^-) et le bismuth-213 (émetteur α).

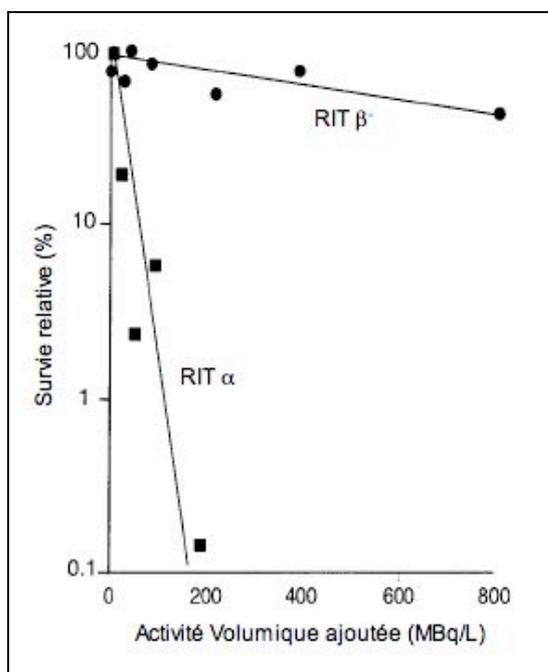


Figure n°23 : Comparaison RIT α / RIT β^- par représentation de la survie relative (%) en fonction de l'activité volumique dans le milieu. Résultats obtenus sur cellules de myélome avec anticorps spécifiques marqués à l'iode-131 (RIT β^-) ou au bismuth-213 (RIT α) [53].

La suite de ce travail de thèse se consacrera à l'étude d'un isotope émetteur de particules α particulier : l'astate-211. Après une partie bibliographique recensant les caractéristiques de cet élément, une partie expérimentale étudiera la façon dont on peut coupler ce radionucléide à une structure protéique de type immunoglobuline.

Chapitre II. La Radio-immunothérapie alpha

II.1. Introduction

En 1926, Claudius Regaud et Antoine Lacassagne avaient prédit que « l'agent idéal du traitement du cancer serait constitué d'éléments lourds, capables d'émettre des rayonnements d'ordre moléculaire, qui seraient administrés dans l'organisme et se fixeraient dans les protoplasmes des cellules que l'on cherche à détruire » [66]. Cette définition visionnaire caractérise parfaitement la radio-immunothérapie alpha qui combine un radionucléide émetteur alpha avec un anticorps spécifique de cellules tumorales (ou péritumorales). Issue de la médecine nucléaire et intégrée pleinement dans l'arsenal des thérapeutiques anticancéreuses hautement ciblées, la radio-immunothérapie est une thérapeutique anticancéreuse de radiothérapie interne permettant de placer, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, une source radioactive directement au contact des cellules ciblées.

Les particules alpha sont des noyaux d'hélium (^4He) à haute énergie. Ces particules présentent un spectre de raies avec un transfert d'énergie linéique élevé de l'ordre de 100 keV/ μm . L'efficacité de ce type d'émetteur en radio-immunothérapie est par ailleurs peu dépendante du niveau d'oxygénation de la tumeur. En effet leur action antitumorale est essentiellement due à des lésions de l'ADN et non à la radiolyse de l'eau et aux radicaux libres [67].

On connaît plus de 100 radioisotopes émetteurs de particules alpha, ce sont tous des éléments « lourds » ayant un numéro atomique supérieur à 82. Longtemps, les émetteurs de particules α ont été considérés comme très radiotoxique car, dans de nombreux cas (radium, polonium,...) on observe une forte fixation osseuse engendrant une aplasie médullaire entraînant la mort. La méthodologie radio-immunothérapeutique permet de contourner cet inconvénient en évitant la biodistribution propre de l'isotope par vectorisation de ce dernier.

Les différents critères permettant de sélectionner les isotopes émetteurs α d'intérêt sont [68] :

- une demi-vie compatible avec une utilisation clinique en radio-immunothérapie,
- le rendement d'émission α ,
- la co-émission de rayonnement X et γ ,
- la demi-vie de l'élément fils produit après désintégration α ,
- les moyens de production (disponibilité, pureté, coût),
- la chimie de l'isotope.

Ces différents critères ont permis de réduire le nombre d'isotopes émetteurs de particules α utilisables en clinique à une liste relativement restreinte (Tableau n°10).

Tableau n°10 : Principaux isotopes émetteurs de particules α utilisables en clinique [69].

Isotope	Demi-vie	Production
Bismuth-212	1,01 heure	Générateur par décroissance du thorium-228
Bismuth-213	0,76 heure	Générateur par décroissance de l'actinium-225
Actinium-225	240 heures	Décroissance du thorium-229
Radium-223	273,6 heures	Décroissance de l'actinium-227
Fermium-255	20,1 heures	Générateur par décroissance de l'einsteinium-255
Terbium-249	4,15 heures	Accélérateur tandem : $^{149}\text{Nd}(^{12}\text{C},5n)^{149}\text{Dy} \rightarrow ^{149}\text{Tb}$
Astate-211	7,21 heures	Cyclotron : $^{209}\text{Bi}(\alpha,2n)^{211}\text{At}$

Parmi ces différents isotopes, le bismuth-212 est le premier à avoir fait l'objet d'études animales ayant conduit au développement de la radio-immunothérapie alpha [70]. Le bismuth-212 présente cependant des difficultés de production en quantité suffisante pour la clinique et une demi-vie relativement brève en regard de la pharmacocinétique d'une immunoglobuline.

L'actinium-225 présente quant à lui une demi-vie très longue mais possède l'inconvénient d'émettre 4 particules α au cours de sa décroissance induisant, par la radiolyse et la diversité chimique des isotopes fils, une très mauvaise stabilité du couplage à l'anticorps [71]. La seule utilisation actuelle de l'actinium-225 est celle de générateur de bismuth-213.

Le bismuth-213 est, en raison de sa disponibilité, un isotope très étudié en radio-immunothérapie α car il est aisément couplé à une structure protéique par l'intermédiaire d'un agent chélatant bifonctionnel de type CHX-A''-DTPA. Une étude clinique de radio-immunothérapie α dans le cadre du traitement de leucémie myéloïde a permis de prouver la faisabilité chez l'humain de cette voie thérapeutique [72].

Le radium-223 présente le même inconvénient de multiplicité d'isotopes fils (4 émissions α) que l'actinium-225. Il a cependant été l'objet d'essais cliniques sous une forme non vectorisée par un anticorps (tropisme naturel osseux) dans le traitement de métastases osseuses [73].

Le fermium-255 et le terbium-249 sont des isotopes présentant des caractéristiques physiques intéressantes mais dont les études sont limitées par les difficultés de production [69].

L'astate-211, qui est le sujet de cette thèse et dont les propriétés seront décrites en détail dans les paragraphes suivants, présente une chimie et une disponibilité particulièrement intéressantes pour un développement clinique à grande échelle de la radio-immunothérapie α .

II.2. L'astate-211

L'astate (At), élément chimique de numéro atomique 85, est le plus lourd des halogènes (groupe VIIa). Mendeleïev a prédit son existence en 1869 et le baptisa « eka-iode » en référence à son homologue halogéné de rang inférieur. L'astate tire son nom actuel du grec *άστατος* (astatos = instable) car tous les isotopes connus de cet élément sont radioactifs. Il a été découvert en 1940 par Emilio Gino Segrè, Dale Raymond Corson et Kenneth Ross MacKenzie à l'université de Berkeley (Californie – Etats Unis) suite à des expériences d'irradiation sur du bismuth-209 par un faisceau de particules alpha accélérés à 32 MeV dans un cyclotron par la réaction suivante :



L'astate étant présent au niveau des chaînes de décroissance de l'uranium-235 de l'uranium-238 et du thorium-232, il est possible de trouver d'infimes quantités de certains de ses isotopes (${}^{215/216/218/219}\text{At}$) en équilibre dans la nature. Les faibles demi-vies combinées aux rapports d'embranchement font de l'astate l'un des éléments naturels les plus rares de la croûte terrestre (probablement moins de 30g).

Parmi les 32 isotopes connus de l'astate (Annexe n°2), un seul présente de bonnes caractéristiques physiques (1/2 vie et émission) pour être utilisé en radio-immunothérapie alpha : l'astate-211.

II.2.1. Production de l'astate-211

Bien que d'autres réactions de production alternatives aient été testées, ces dernières ont démontré de nombreuses difficultés d'ordre technique (accélération des particules, extraction chimique,...) et la voie préférentielle [74] de production d'astate-211 pour un usage radiopharmaceutique repose sur la réaction ${}^{209}\text{Bi}(\alpha,2n){}^{211}\text{At}$ initialement utilisée lors de la découverte de l'astate.

L'élément cible utilisé lors d'un bombardement cyclotron est un isotope stable du bismuth disponible au niveau commercial avec un grand degré de pureté. Cette réaction de bombardement du bismuth-209 présente une section efficace maximale d'environ 950 mb pour des particules α incidentes d'énergie 31 MeV.

La production pour usage pharmaceutique d'astate-211 requiert une très grande pureté radionucléidique avec une réduction *a minima* des deux impuretés produites lors du tir cyclotron : l'astate-210 ($T_{1/2} = 8,1$ heures, $CE/\beta^+ 99,8\%$) formé par la réaction $^{209}\text{Bi}(\alpha,3n)^{210}\text{At}$ et le polonium-210 ($T_{1/2} = 138,2$ jours, $E_{\alpha} = 5,304$ MeV) issu de la décroissance de l'astate-210 [75] et formé par la réaction $^{209}\text{Bi}(\alpha,^3\text{H})^{210}\text{Po}$ (Figure n°24). Il est à noter que le polonium présente un fort tropisme pour le tissu osseux et engendre *de facto* une toxicité médullaire incompatible avec une utilisation clinique [76].

Pour ces raisons de pureté, l'énergie des particules α classiquement utilisées est de 28,0 MeV (inférieure à la valeur seuil de 28,6 MeV [77] à partir de laquelle l'astate-210 commence à être produit) et permet d'obtenir un rendement de production cyclotron de 6,78 GBq/A.s pour l'astate-211 ($\sigma_{28,0 \text{ MeV}} = 733 \text{ mb}$) [78]. Il est à noter que la production directe de ^{210}Po par la réaction $^{209}\text{Bi}(\alpha,^3\text{H})^{210}\text{Po}$, bien que faible à cette énergie (0,011 GBq/A.s), n'est pas problématique dans la mesure où la dose limite annuelle recommandée pour cet isotope du polonium est de 10 kBq [79] et que les méthodes d'extraction de l'astate-211 permettent de l'éliminer [80].

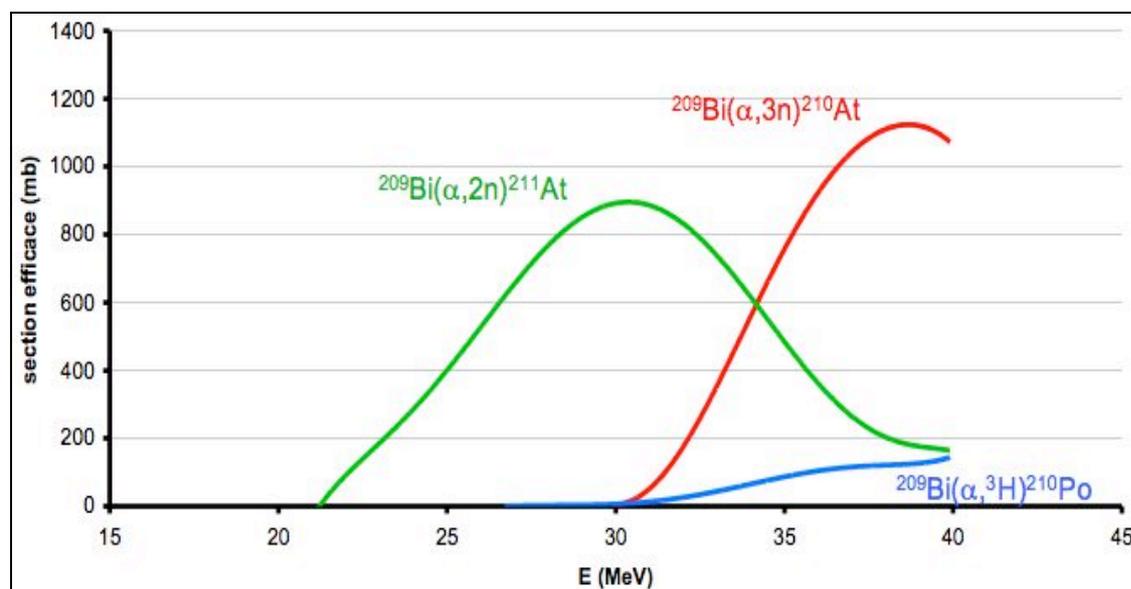


Figure n°24 : Représentation des sections efficaces des réactions nucléaires de bombardement de bismuth-209 en fonction de l'énergie des particules alpha incidentes (d'après [80]).

II.2.2. Propriétés physiques de l'astate-211

L'astate-211 (^{211}At), de période 7,241 heures, se désintègre par capture électronique (58,2 %) ou par émission de particules alpha (41,8 %) en polonium-211 et en bismuth-207 respectivement. Le polonium-211 est un émetteur alpha (100 %) et se désintègre en plomb-207 stable avec une demi-vie de 516 ms. Le même isotope stable du plomb (^{207}Pb) est obtenu après la décroissance par capture électronique (100 %) du bismuth-207 avec une demi-vie de 32,9 ans (Figure n° 25) qui, malgré cette demi-vie très longue par rapport à l'espérance de vie humaine, ne pose pas de problème majeur en terme de radiotoxicologie dans la mesure où seulement 0,033 MBq de bismuth-207 sont produits pour 37 MBq d'astate-211 initial [81].

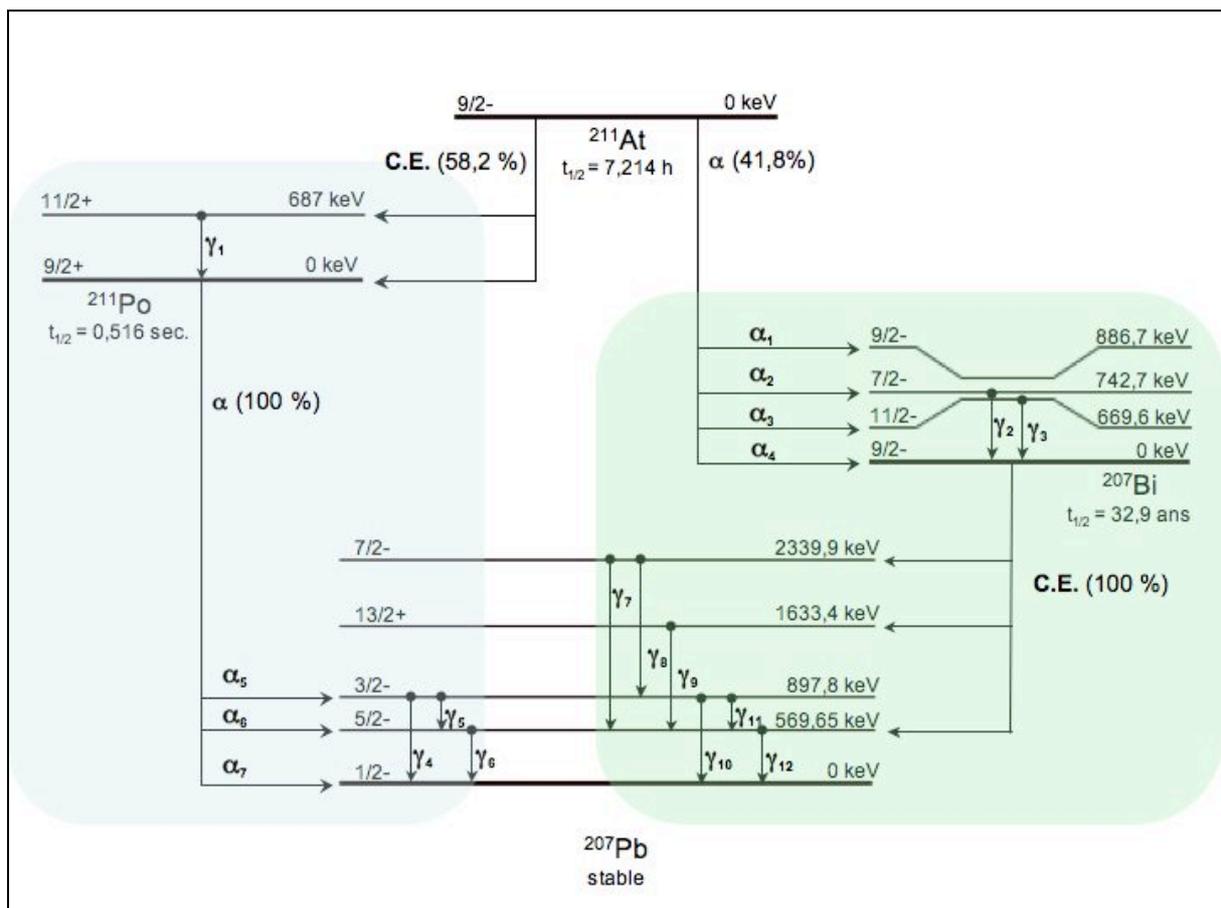


Figure n° 25 : Schéma de désintégration de l'astate-211.

Au total, si l'on considère un temps infini de décroissance permettant de tenir compte des rayonnements émis par le bismuth-207 ($T_{1/2} = 32,9$ ans), on observe 3,96 émissions par désintégration d'astate-211 qui sont réparties comme suit :

- Particules α : 1 ;
- Électrons (Auger et conversion interne) : 1,4 ;
- Photons γ : 0,76 ;
- Rayonnements X : 0,80.

Les raies énergétiques de chacun des rayonnements ainsi que leur intensité respectives et leurs impacts dosimétriques sont répertoriés dans l'annexe n°3.

II.2.2.1. Spectrométrie alpha

La spectrométrie alpha d'un échantillon d'astate-211 montre (Tableau n°11 et Figure n°26) quatre raies principales attribuées comme suit (remarque : un pic surnuméraire d'énergie 5304,3 keV apparaît en cas de contamination par du polonium-210) :

Tableau n°11 : Energie et intensité des particules alpha émises par l'astate-211.

Energie (keV)	Intensité relative d'émission (% d' ²¹¹ At)	Origine de l'émission
5869,5	41,8	²¹¹ At → ²⁰⁷ Bi
6568,3	0,31	²¹¹ Po → ²⁰⁷ Pb
6891,5	0,33	²¹¹ Po → ²⁰⁷ Pb
7450,3	57,5	²¹¹ Po → ²⁰⁷ Pb

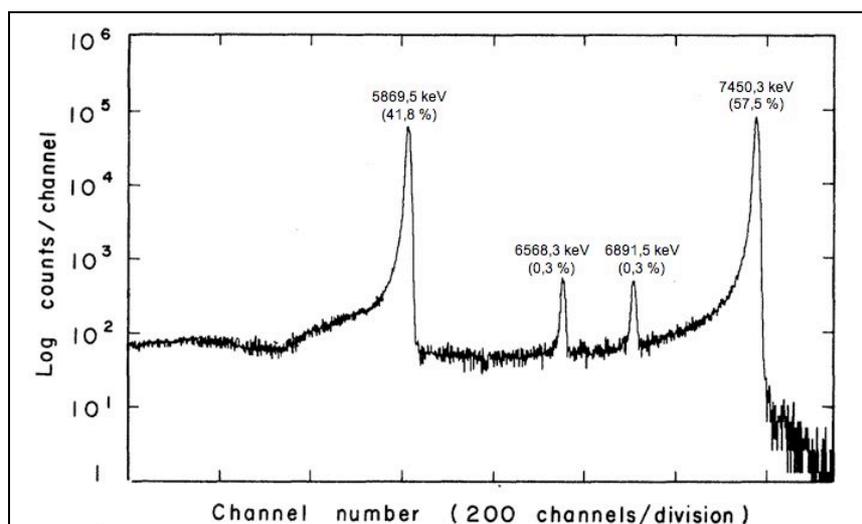


Figure n°26 : Spectrométrie alpha d'un échantillon d'astate-211 (d'après [82]).

Les particules alpha de l'astate-211 présentent un transfert d'énergie linéique (TEL) dans l'eau d'environ 98 keV/ μm ce qui engendre un parcours maximum pour ces particules de 77 μm dans un tissu biologique [83, 84].

II.2.2.2. Spectrométrie X et γ

L'analyse spectrométrique des rayons X et γ d'un échantillon d'astate-211 mesuré sur un scintillateur NaI(Tl) montre deux zones d'intérêt (Figure n°27). En effet, les 4 pics γ présents dans l'intervalle 200-1500 keV permettent une identification et une mesure de la pureté radionucléidique de notre échantillon d'astate-211 (des pics surnuméraires d'énergie 245,3 et 1181,4 keV apparaissent en cas de contamination par de l'astate-210).

De plus la spectrométrie des rayons X montre un massif de pics très intense dans l'intervalle 75 – 95 keV. Cette intensité permet une très bonne détection des sources d'astate-211 tant au niveau de la mesure de l'activité *in vitro* d'un échantillon que du suivi dosimétrique par imagerie d'une dose d'astate injectée *in vivo*.

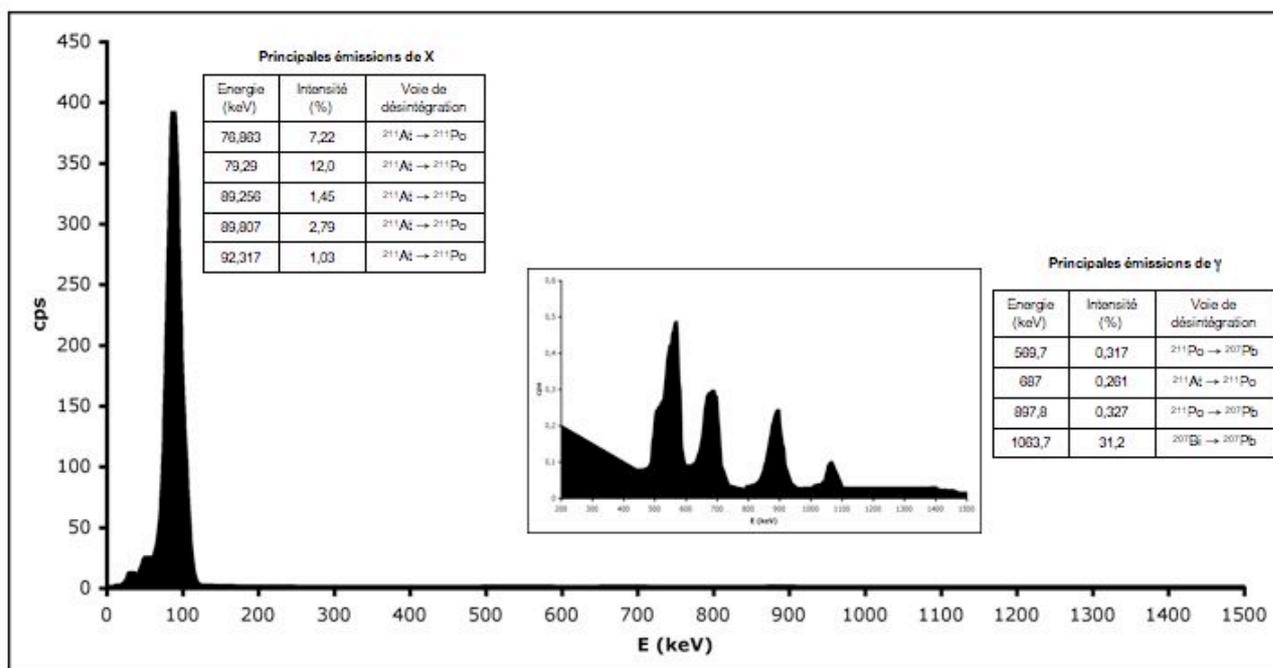


Figure n°27 : Spectrométrie X et gamma d'un échantillon d'astate-211.

II.2.3. Extraction et purification de l'astate-211

La technique d'extraction la plus fréquemment rencontrée dans la littérature est une technique par voie sèche qui consiste à sublimer l'astate-211 depuis la cible de bismuth-209 dans un four dont la température est comprise entre 500 et 700°C [85]. A cette température, le bismuth et le polonium sont à l'état liquide car leurs températures de fusion sont respectivement 271,4 °C et 254 °C, l'astate est le seul élément gazeux à cette température (température d'ébullition : 337 °C). Historiquement, l'astate gazeux était récupéré par adsorption sur une surface métallique de platine ou d'argent [86], aujourd'hui 2 techniques issues de ce principe sont utilisées (Figure n°28) :

- La cible est introduite dans un four chauffé à 670°C, la surface de la cible est parcourue par un gaz inerte (azote ou argon) et les vapeurs issues du four sont piégées par barbotage dans un solvant de type méthanol, soude ou chloroforme réfrigéré à 0°C [87].
- La cible est introduite dans un four chauffé à 650°C, la surface de la cible est parcourue par un gaz inerte (azote). Les vapeurs issues du four sont conduites dans un capillaire en PEEK plongé dans un mélange réfrigérant de glace carbonique / méthanol à -77°C. L'astate condensé dans le capillaire est récupéré par rinçage du tube capillaire à l'aide de méthanol, soude ou chloroforme [88].

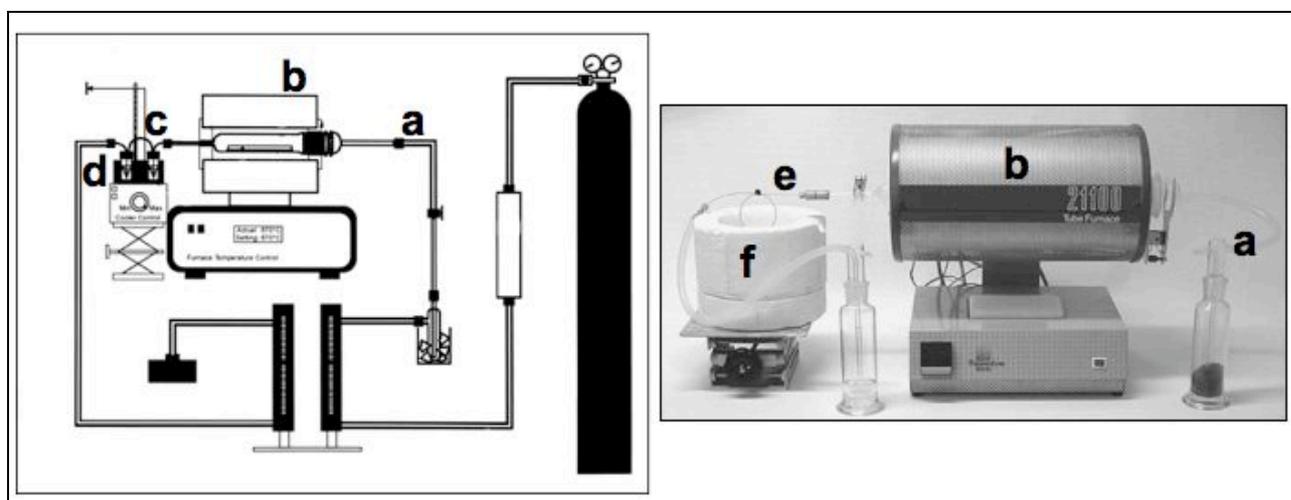


Figure n°28 : Extraction par sublimation de l'astate-211. A gauche : récupération par barbotage. A droite : récupération par condensation. a. arrivée de gaz inerte, b. four, c. flacon de barbotage, d. bloc réfrigérant à 0°C, e. capillaire PEEK, f. mélange réfrigérant carboglace/éthanol à -77 °C.

Cette technique d'extraction par voie sèche conduit à des rendements d'extraction de l'ordre de 70 % en 25 minutes.

Une alternative à cette technique d'extraction par voie sèche a été développée, elle consiste en une attaque acide de la cible suivie par une extraction de l'astate par un solvant organique de type di-isopropylether [85]. Cette technique retenue pour ce travail de thèse et expliquée dans la partie expérimentale a l'avantage de présenter une répétabilité et un meilleur rendement d'extraction que la voie sèche [89].

II.2.4. Propriétés biologiques de l'astate-211

L'administration d'astate-211 conduit à une accumulation de cet élément au niveau des glandes thyroïdes similaire à celle de l'iode chez le cobaye [90] avec pour conséquence une thyroïdectomie radiative complète chez le rat à partir de doses de 30 μCi (1,1 MBq) [91]. Cette atteinte thyroïdienne due à l'astate-211 a été confirmée par une étude radiotoxicologique chez le singe où l'on a observé différentes pathologies caractéristiques de l'hypothyroïdisme (gain de poids, bradycardie, retard de croissance ...) [92]. En plus de ces effets thyroïdiens, l'injection d'astate à des rattes conduit à un passage d'astate au niveau du lait maternel et à une augmentation de l'incidence des tumeurs mammaires et hypophysaires [93].

Des études d'escalade de doses chez la souris ont démontré des doses létales 10 (DL_{10}) de 15,1 μCi (28,1 kBq/g) chez la souche B6C3F₁ et de 7,7 μCi (14,4 kBq/g) chez la souche Balb/c (nu/nu). Le suivi des souris sur 360 jours a montré, en plus des effets thyroïdiens, des signes généraux avec perte de poids, aplasie médullaire sévère, atrophie testiculaire et perte de poils. Après autopsie, on retrouve au plan histologique des anomalies [94] dans les organes suivants :

- l'estomac (atteintes nucléaires de la muqueuse épidermoïde),
- le système cardio-vasculaire (fibrose),
- le foie (polymorphisme nucléaire, nécrose centro-lobulaire et adénome bénin),
- la rate (hyperplasie mégacaryocytaire, hématopoïèse extra-médullaire, atrophie de la pulpe splénique),
- les reins (nécrose tubulaire aiguë et adénome tubulaire bénin).

Tout comme l'iode, l'astate s'accumule notamment dans les cellules exprimant le symporteur sodium/iode (NIS) [83, 95]. Le symporteur NIS est une protéine localisée dans la membrane basolatérale des thyrocytes permettant, dans les conditions physiologiques, le co-transport d'un ion iodure avec deux ions sodium générant ainsi un gradient électrochimique utilisé comme énergie pour accumuler l'iode dans la cellule. Le NIS est à

l'origine de l'accumulation d'astate dans la thyroïde, les glandes salivaires, l'estomac et la glande mammaire en période de lactation (Figure n°29) [96].

Au niveau de la thyroïde, l'expression du NIS est essentiellement sous le contrôle de la Thyroid Stimulating Hormon (TSH) et il est possible de bloquer l'accumulation d'astate et d'iode dans les cellules exprimant le NIS par administration préalable d'iodure (I^-), de periodate (IO_4^-), de perchlorate (ClO_4^-) ou de thiocyanate (SCN^-) [83, 97].

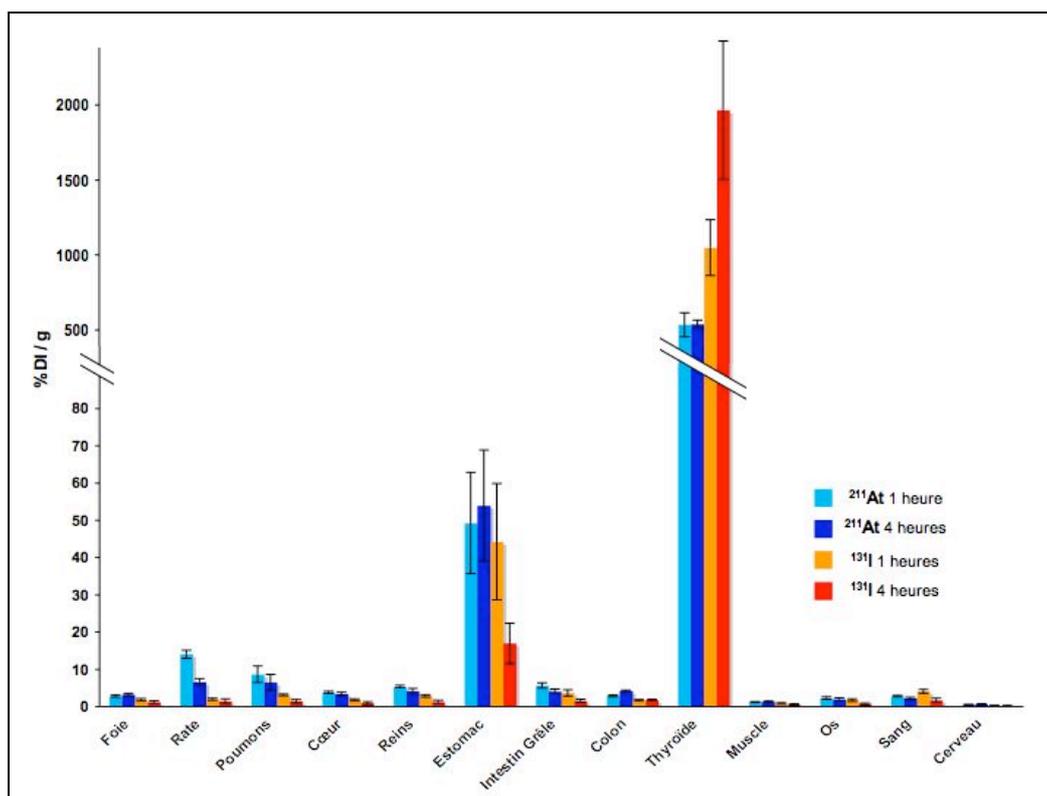


Figure n°29 : Biodistribution en pourcentage de dose injectée par gramme de tissu chez la souris pour l'astate-211 et l'iode-131 à 1 heure et 4 heures après injection. Les données thyroïdiennes sont calculées pour un poids moyen de thyroïde de 5 mg pour une souris de 20 g [97].

II.2.5. Propriétés chimiques de l'astate

Les avantages radiobiologiques de l'astate-211 dans le cadre d'utilisation thérapeutique de cet isotope dépendent grandement de la capacité avec laquelle on peut coupler cet élément chimique de façon stable (*in vitro* et *in vivo*) à un vecteur spécifique de l'organe ou de la tumeur à traiter.

Les divers isotopes de l'astate qui sont tous radioactifs avec des demi-vies relativement courtes (demi-vie maximale de 8,1 h pour l'astate-210) ne sont produits qu'à l'état de trace (de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-15} mol/L) ce qui ne permet pas une étude approfondie de la chimie de cet élément par les moyens analytiques conventionnels (spectroscopie UV,

IR, RMN ou spectrométrie de masse). La chimie de l'astate est essentiellement une chimie descriptive faite à l'aide de traceurs. Elle est compliquée par le fait que les petites quantités d'astate présentes dans le milieu à analyser sont de l'ordre de grandeur des impuretés que l'on considérerait normalement comme négligeables.

Néanmoins, par extrapolation de la chimie des autres halogènes (fluor, chlore, brome et iode), il est possible de déduire des caractéristiques générales à l'astate qui présente un atome plus volumineux (augmentation des distances de Van der Waals et des liaisons covalentes) ainsi que des températures de fusion et d'évaporation plus élevées que pour les autres halogènes. L'astate présente également un caractère électropositif métallique plus marqué que ses homologues (Tableau n°12). Cette dernière caractéristique confère à l'astate des propriétés métalliques qui le rapproche sur ce point plus de la chimie du polonium que de celle de l'iode [98].

Tableau n°12 : Comparaison des paramètres physico-chimiques des halogènes.

Paramètre	F	Cl	Br	I	At	Référence
Rayon covalent* (Å)	1,43	1,70	1,83	1,99	2,09	[99]
Rayon de VdW* (Å)	1,54	1,86	1,97	2,11	2,14	[99]
Electronégativité	3,95	3,03	2,80	2,47	2,2	[100]
Potentiel d'ionisation de HX (eV)	15,6	12,2	11,4	10,3	9,7	[101]
Distance H-X (pm)	92	128	141	161	176	[101]
Enthalpie de dissociation H-X (kJ/mol)	565	428	362	295	/	[102]
Distance X ₂ (pm)	186	262	286	326	347	[101]
T°C de fusion (X ₂)	-219,7	-101,5	-7,2	113,7	302	[100]
T°C évaporation (X ₂)	-188,1	-34	58,8	184,4	337	[100]
Enthalpie de dissociation X ₂ (kJ/mol)	158,8	242,6	192,8	151,1	120	[103]

* mesuré sur liaison O-X d'acide hypohaleux (HOX)

Les 6 différents degrés d'oxydation de l'astate et leurs potentiels sont présentés dans la figure n°30.

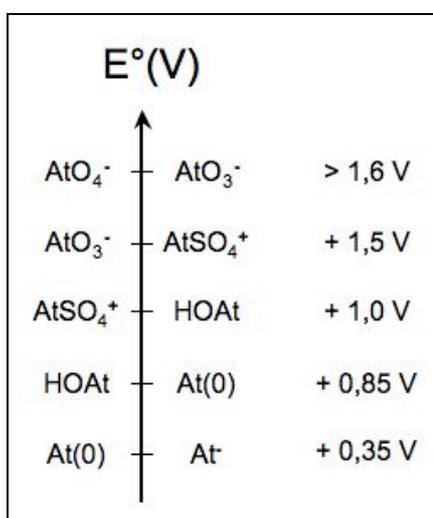


Figure n°30 : Différents états et potentiels redox de l'astate [104].

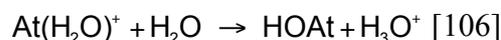
Le degré d'oxydation le mieux défini de l'astate est le degré -I. L'astate peut aisément être réduit en astature par différents agents comme le zinc, l'arsenic (III) ou le dioxyde de soufre :



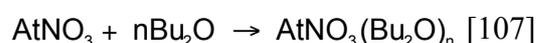
L'anion astature est stable dans les solutions aqueuses contenant des agents réducteurs à pH > 6 et présente une chimie similaire à celle des iodures avec un comportement d'acide mou selon la classification HSAB de Pearson.

La plupart des études sur At(0) sont conduites dans un excès d'iode qui bloque l'astate dans des molécules inter-halogénées de type AtI qui se comportent essentiellement de la même manière que I₂ [105]. At(0) qui est la forme majoritaire à pH acide présente une grande volatilité et une tendance à l'adsorption sur les métaux et sur le verre. Il est possible d'extraire At(0) dans des solvants organiques comme le tetrachlorométhane, le chloroforme et l'éther di-isopropylique [104] et il peut être oxydé à différents degrés positifs par des oxydants plus ou moins puissants.

Le degré d'oxydation At(I) peut être obtenu en réduisant l'ion astatate (degrés d'oxydation +V) par l'ion chlorure ou en oxydant At(0) par l'ion ferrique. Ce degré d'oxydation de l'astate ne précipite pas avec l'argent comme l'anion astature (At⁻) ou avec le baryum comme l'anion astatate (AtO₃⁻). A pH alcalin, le cation At(I) se trouve sous la forme At(OH)₂⁻. A pH neutre, on observe la formation d'un complexe aqueux AtH₂O⁺ s'hydrolysant suivant la réaction suivante :

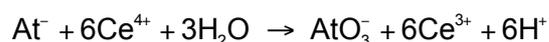


Pour les formes alcalines et neutres, il n'est pas possible d'extraire l'astate At(I) dans des solvants apolaires comme le tetrachlorométhane ou l'heptane. A pH acide, l'astate At(I) se trouve sous la forme AtX (X= HSO₄⁻, NO₃⁻) pour laquelle l'extraction par des solvants organiques est possible par remplacement d'une molécule d'eau par une molécule d'un solvant organique comme l'éther butylique (Bu₂O) :



Le degré d'oxydation At(III) est obtenu après oxydation par le peroxodisulfate dilué ou des dichromates sous les formes AtSO_4^+ ou AtCrO_4^+ . En terme de complexation, le comportement de At(III) est assez proche de At(I) avec néanmoins un caractère acide de Lewis plus marqué induisant des complexations préférentielles avec des bases dures de Lewis comme l'eau, l'éther butylique et les anions de type Cl^- ou NO_3^- .

Le degré d'oxydation positif le mieux caractérisé est At(V). Les ions astatates peuvent se former par oxydation de At par le peroxodisulfate, l'ion cérique ou le periodate :



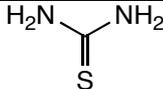
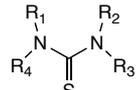
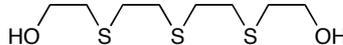
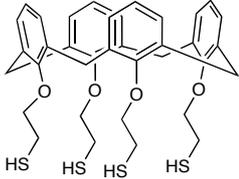
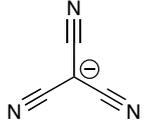
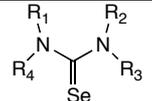
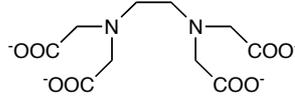
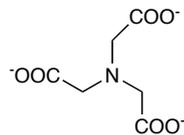
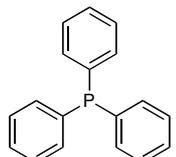
L'anion astatate peut être précipité en présence d'iodates insolubles comme $\text{Pb}(\text{IO}_3)_2$ et $\text{Ba}(\text{IO}_3)_2$ [104].

Le degré d'oxydation At(VII) correspondant à l'ion perastatate (AtO_4^-) et à l'acide perastatique (H_5AtO_6) ne peut être observé qu'en présence d'agents oxydants très puissants comme le difluorure de xénon (XeF_2/OH^- à chaud) [108].

II.2.5.1. Chimie de complexation de l'astate

Comme nous venons de le voir, la chimie de l'astate est très variée et peut permettre d'obtenir des espèces cationiques qu'il est possible de complexer par des liaisons datives avec des entités donneuses d'électrons. Ainsi, il est possible de préparer la forme cationique At^{x+} par ajout d'acide nitrique 0,1 N et de dichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 0,01 M à 100°C pendant 5 minutes [107] ou par ajout de perchlorate de sodium (NaClO_4) 0,5 M [109]. Cette forme cationique At^{x+} est un acide mou au sens de la classification HSAB de Pearson et peut être liée de façon stable par des molécules présentant des centres électronégatifs donneurs d'électrons de type bases molles le plus souvent (Tableau n°13).

Tableau n°13 : Différents agents complexant de l'astate.

Type	Ligand	Formule	Référence
	Thiourée		[110]
	N-Acylthiourée		[110]
Ligands soufrés		$R_1, R_2, R_3, R_4 = -CH_3 \text{ ou } H$	
	Bis-(2-mercaptoethyl)sulphide		[109]
	Calixarène		[111]
Ligands azotés	Tricyanométhanide		[112]
	Azide		[112, 113]
Ligands séléniés	N-acylselenocarbamide		[114]
		$R_1, R_2, R_3, R_4 = -C_2H_5, -CH_3 \text{ ou } H$	
Ligands acides amino-polycarboxyliques	EDTA		[115]
	Acide nitrilotriacétique		[116]
Ligands phosphorés	Triphenylphosphine		[117]

La forme la plus réduite de l'astate (ion astature : At^-) obtenu par un mélange de sulfite et nitrate de sodium (Na_2SO_3 et NaNO_3) présente un comportement d'acide mou selon la classification HSAB de Pearson et peut former des complexes stables avec des cations métalliques considérés comme des bases molles (Hg^{2+} , Pt^{2+} , Pd^{2+} , Rh^{3+} , Ag^+ , Tl^{3+} , ...) [118].

Ces propriétés de liaison de l'astature envers des bases molles peuvent être utilisées afin de coupler de l'astate à un métal (rhodium Rh^{3+} ou iridium Ir^{3+}) lui même incorporé dans un ligand de type tetrathioether comme le 1,5,9,13-tetrathiacyclohexadecane-3,11-diol (16-S4-diol) (Figure n°31) [119, 120]. L'utilisation de ce type de dérivé permet d'obtenir de bons rendements de fixation d'environ 85-90 % (rendements légèrement supérieurs pour le complexe rhodium par rapport au complexe iridium) en 1h30 à 90°C ou en 30 minutes sous micro-ondes. Les complexes d'astate ainsi formés présentent une bonne stabilité *in vitro* (absence de déhalogénéation après 48 heures en tampon phosphate à pH = 7,4).

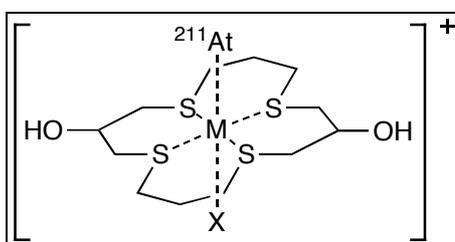


Figure n°31 : Complexe de $^{211}\text{At-M}(16\text{-S4-diol})$; $M = \text{Rh}^{3+}$ ou Ir^{3+} ; $X = \text{NO}_3$; OH ou Cl

II.2.5.2. Chimie de covalence de l'astate

La chimie des halogènes présente la possibilité de réaliser des liaisons covalentes avec un autre élément. Ainsi, la faisabilité de liaison entre un atome d'astate et un atome de carbone ou un atome de bore a été démontrée. Au sein de la série halogène, on observe une diminution de l'énergie de liaison carbone-halogène inversement liée à l'augmentation de la masse atomique ($\text{C-F} > \text{C-Cl} > \text{C-Br} > \text{C-I} > \text{C-At}$). Cette diminution dans l'énergie liaison est de plus inversement proportionnelle à la longueur la liaison carbone-halogène (Tableau n°14) [102].

Tableau n°14 : Energie des liaisons carbone - halogène (C – X) en kJ/mol.

Halogène (X)	Phényl - X	Alkyl - X
F	523	444
Cl	398	339
Br	335	285
I	268	222 +/- 12
At	197 +/- 20	163 +/- 12

Compte tenu des remarques générales évoquées sur la chimie de l'astate, on constate que les différents paramètres de cette dernière sont relativement proches de la chimie de l'iode bien que présentant une moindre stabilité au niveau des liaisons covalentes.

En général, les méthodes de marquage utilisées dans le cas de l'iode sont transposables au brome, à l'astate et avec réserve au fluor. Dans un but thérapeutique, la stabilité *in vivo* des molécules marquées à l'astate doit être grande or, on remarque que pour l'iode, la liaison entre un C sp^3 et l'iode est en général trop faible (222 kJ/mol) pour présenter cette stabilité. L'iode est donc en général fixé sur un carbone sp^2 ou sur un carbone sp^3 situé en β d'une liaison C-O.

Les diverses méthodes mises au point pour l'halogénéation des composés organiques en chimie froide restent dans leur ensemble valables dans le cas de la radiohalogénéation. L'utilisation d'astate requiert cependant une adaptation de ces méthodes tenant compte de la période relativement courte de l'élément (cinétique réactionnelle), de l'absence d'isotope stable ainsi que de sa faible concentration dans le milieu réactionnel.

Le tableau n°15 rassemble les réactions les plus couramment utilisées pour lier un atome d'halogène à une structure organique.

Dans la mesure où la position finale de l'halogène est déterminante sur les propriétés biologiques de la molécule radiomarquée (lorsque celle-ci est le vecteur biomimétique), les réactions d'halogénéation directes, c'est-à-dire le remplacement d'un atome d'hydrogène par un atome d'halogène sont des réactions à écarter dans la mesure où elle ne sont pas, sauf cas particuliers régiospécifiques, engendrant de fait la synthèse d'un mélange d'isomères. Les réactions d'halogénéation indirectes, nécessitant au préalable l'introduction dans la molécule d'un groupement partant facilement remplaçable par l'halogène, permettent de résoudre cet inconvénient de régiospécificité.

La stéréospécificité lors du marquage est un but qu'il peut être important d'atteindre dans le cadre de certains couplages. En effet, il est connu que différents isomères de configuration peuvent présenter des propriétés biologiques différentes. Ce phénomène qui ne se pose pas lorsque l'halogénéation a lieu sur un cycle aromatique peut revêtir une grande importance lorsque cette halogénéation s'effectue sur une chaîne aliphatique. Il est à noter que l'énergie de liaison carbone-astate dans la série aliphatique n'est pas suffisamment grande pour être envisagée en clinique. Dans le cas particulier de l'astate, seul le couplage en série aromatique ou hétérocyclique présente une énergie de liaison suffisante pour être envisageable en radio-immunothérapie.

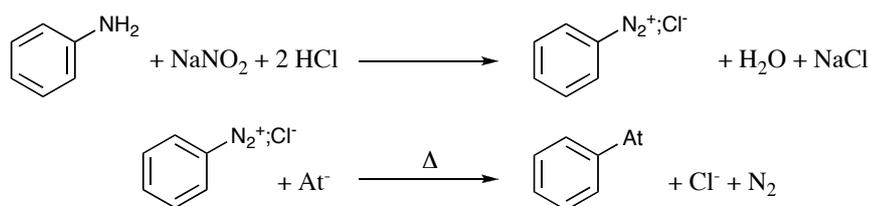
Le tableau n°15 permet de constater que si aucune méthode ne présente tous les avantages requis (à savoir halogénéation directe, régiospécificité et stéréospécificité),

certaines, qui cumulent les inconvénients, ne présentent que très peu d'intérêt : SN 1 aliphatique, SE 1 aliphatique et voie des arynes. Il est à noter que la substitution isotopique utilisable pour certains halogènes comme l'iode est inutilisable dans le cas de l'astate où il n'existe aucun isotope stable.

Enfin, il est important de remarquer que l'ensemble de ces méthodes ainsi que l'évolution dans la fréquence de leur utilisation en radiohalogénéation sont dépendantes des progrès effectués ces dernières années dans la chimie froide des substitutions électrophiles aliphatiques vinyliques ou aromatiques d'un organométallique qui, dans le cas de l'iode, ont démontrés *in vivo* une très grande stabilité de la liaison C - I.

Les différents essais menés dans le marquage de molécules organiques par de l'astate ont utilisé, parmi les méthodes classiques de radiohalogénéation, des réactions de :

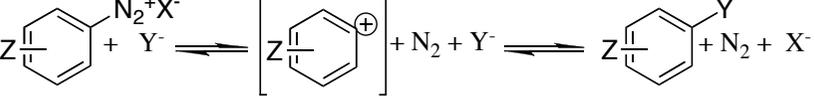
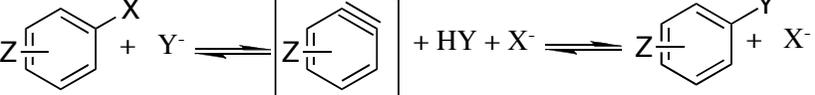
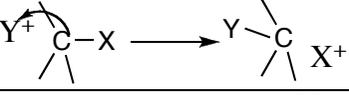
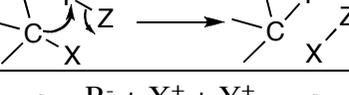
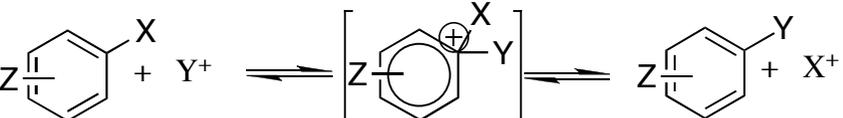
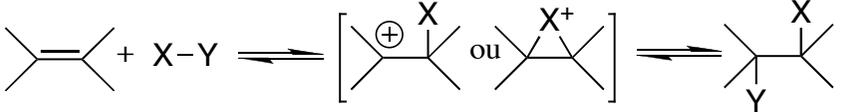
- Substitution nucléophile aromatique (SN-Ar) d'un hydrogène ou d'un halogène (transhalogénéation) : les réactions de substitution d'un atome d'hydrogène sur le toluène se sont avérées non régiosélectives [121]. Les réactions de transhalogénéation comme dans le cas du chlorobenzène [122] ou de l'iodobenzène permettent d'obtenir une bonne regio-sélectivité.
- Substitution nucléophile (SN₁) : cette réaction qui utilise des sels de diazonium (réaction de Sandmeyer) permet l'introduction d'un halogénure sur une position bien définie d'un cycle aromatique. La réaction se déroule classiquement en deux étapes [102] :



Cette réaction de couplage est cependant limitée dans son utilisation car elle présente les inconvénients suivants :

- Le sel de diazonium, qui doit être préparé *in situ*, est souvent faiblement soluble dans le milieu réactionnel ce qui nécessite de conduire la réaction en milieu hétérogène. Les conditions fortement oxydante (NaNO₂), le faible pH (HCl) et chauffage final (50-100°C) ont souvent pour conséquence d'altérer le substrat lors du marquage.

Tableau n°15 : réactions chimiques permettant d'halogéner une molécule organique [102].

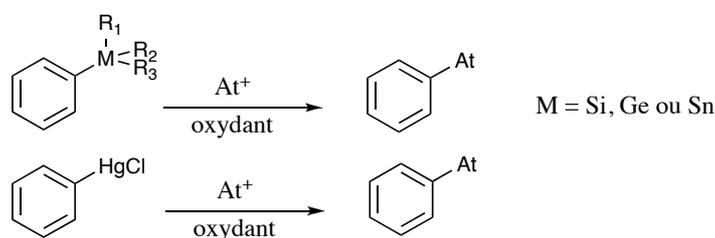
Type de réaction			Halogénéation			
			Sur C portant X ou régiospécifique	Stéréospécifique	Directe	
Substitution nucléophile (SN)	Aliphatique X ≠ H	SN 2	$RX + Y^- \rightleftharpoons [X-R-Y] \rightleftharpoons RY + X^-$	+	+	-
		SN 1	$RX + Y^- \rightleftharpoons R^+ + X^- + Y^- \rightleftharpoons RY + X^-$	+/- *	-	-
	Aromatique X ≠ H Z ≠ H	SN Ar		+		-
		SN 1		+		-
		Aryne		-		-
Substitution électrophile (SE)	Aliphatique X ≠ H	SE 2 frontale		+	+	-
		SE 2 anti		+	+	-
		SE i		+	+	-
		SE 1	$RX + Y^+ \rightleftharpoons R^+ + X^- + Y^+ \rightleftharpoons RY + X^+$	+/- *	-	-
	Aromatique X = H Z = M(R) _n	SE Ar		- +		+ -
Addition électrophile	Aliphatique X = H X, Y ≠ H			+/- * +/- *	- +	+ +

- La coupure de la liaison aryl – N₂ précède la réaction d'halogénéation au cours de laquelle l'halogénure se comporte comme un réactant passif avec peu d'effet de concentration sur la réaction. Dans le cas de la radiohalogénéation réalisée sans entraîneur (cas de l'astate), il faut utiliser de fortes concentrations de sels de diazonium pour limiter la compétition des molécules de solvants.

- Bien que le départ d'azote conduise à la formation d'un cation phényle intermédiaire en solution aqueuse, dans la plupart des autres solvants, les mécanismes ioniques et radicalaires jouent tous les deux un rôle important et il se forme par conséquent un grand nombre de composés secondaires plus ou moins difficile à éliminer rendant cette réaction inenvisageable.

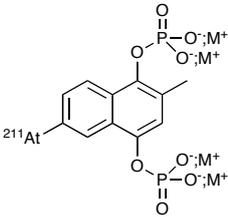
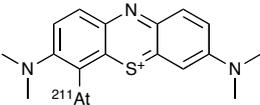
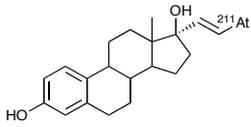
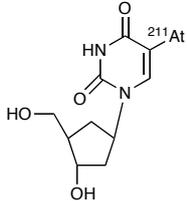
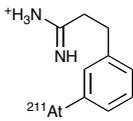
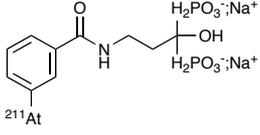
- Substitution électrophile aromatique (SE-Ar) d'un hydrogène ou d'un organométallique : cette réaction requiert l'oxydation de l'halogénure soit avant l'étape de marquage proprement dite soit *in situ*. L'utilisation de groupement orienteur comme dans le cas de la tyrosine [121] permet d'obtenir avec de bons rendements (60%) la substitution d'un ou de plusieurs atomes d'hydrogènes afin de conduire à un cycle aromatique mono- ou poly- halogéné. Ce risque de polyhalogénéation n'existe pas lorsque l'on utilise la réaction de SE-Ar sur un organométallique. En effet, la liaison carbone - métal (C-M) possède un caractère polaire plus marqué que la liaison carbone – hydrogène (C-H) ainsi qu'une énergie de liaison inférieure à cette dernière. Ces caractéristiques expliquent en grande partie pourquoi la réaction de substitution électrophile s'effectue sur le carbone de la liaison C-M de la molécule à halogéner. Dans la série des métaux du groupe IV (silicium, germanium, étain) la différence de réactivité des organométalliques (Si<Ge<Sn) est expliquée par les différences de stabilité et de longueur de la liaison carbone – métal.

Cette grande réactivité de la liaison C-M permet d'assurer en outre la régiospécificité du marquage ainsi que la rapidité de la réaction dans des conditions douces et avec un rendement radiochimique élevé suivant la réaction suivante :



Différents essais de marquages de molécules organiques à de l'astate utilisant ces voies de marquage sont référencés dans le tableau n°16.

Tableau n°16 : Molécules organiques marquées à l'astate-211

Molécule	Voie d'obtention	Pathologie	Conclusion	Référence
 <p>6-[²¹¹At]astato-2-méthyl-1,4-naphtoquinol diphosphate</p>	Diazonium et transhalogénéation	Adénocarcinome rectal	Toxicité pulmonaire et lymphome	[123]
 <p>4-[²¹¹At]astato-méthylene blue</p>	Substitution électrophile d'un hydrogène aryllique	Mélanome	Autorisation de phase I humaine	[124-128]
 <p>17α-[²¹¹At]astato-vinylestradiol</p>	Démétallation d'un groupement tributylstannyl en position vinylique	/	/	[129]
 <p>5-[²¹¹At]astato-2'-deoxyuridine</p>	Démétallation d'un groupement triméthylstannyl en position aryllique	Glyome et mélanome	Instabilité <i>in vivo</i>	[130, 131]
 <p>Meta-[²¹¹At]astatobenzylguanidine</p>	Démétallation d'un groupement triméthylsilyl ou tributylstannyl en position aryllique	Neuroblastome phéochromocytome		[132-134]
 <p>3-[²¹¹At]astato-benzamide-N-3-hydroxypropylidene-3,3-bisphosphonate</p>	Démétallation d'un groupement triméthylstannyl en position aryllique	Palliatif dans les métastases osseuses	Accumulation dans organes sains	[135-137]

L'utilisation de cette chimie d'halogénéation par astato-déstannylation électrophile sur un atome de carbone a également permis de radiomarquer des structures peptidiques dérivées de la somatostatine (Figure n°32). La somatostatine est une hormone peptidique (14 acides aminés pour la forme principale), synthétisée par l'hypothalamus, les cellules D pancréatiques et intestinales, et dont on observe de nombreux récepteurs sur certaines tumeurs gastro-entéro-pancréatiques d'origine neuro-endocrines. Ce type de composé présente en général une bonne stabilité *in vitro* mais présente un fort métabolisme cellulaire *in vivo* après internalisation du peptide avec un fort relargage extracellulaire [138, 139] d'astate libre chez l'animal depuis la tumeur vers les organes sains (thyroïde, estomac, poumons et rate).

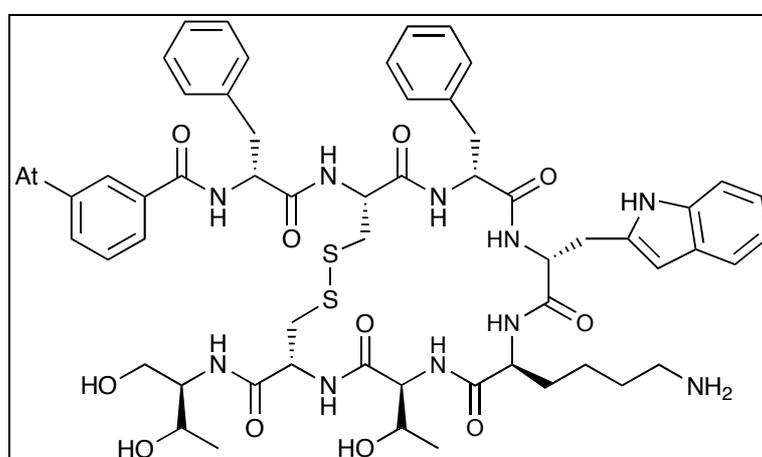


Figure n°32 : Analogue de la somatostatine de type octreotide marqué à l'astate-211 [140].

Une autre voie de synthèse reposant sur la faisabilité d'une liaison covalente entre un atome d'astate et un atome de bore a été développée ces dernières années. Cette technique permet en effet de coupler l'astate à une cage de bore anionique de façon stable. Cette cage présente une structure icosaédrique (Figure n°33) et permet un radiomarquage en 15 minutes en présence d'un agent oxydant (chloramine T) relativement stable *in vitro* (81 à 88 % de l'astate reste fixé après 15 heures d'incubation en tampon PBS)[141, 142].

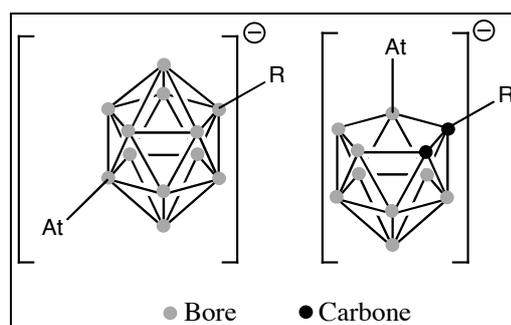


Figure n°33 : Structure closo-dodécaborate (à gauche) et nido-carborane (à droite).

II.2.6. Couplage de l'astate à des structures protéiques

Comme nous venons de le voir, la chimie de l'astate présente de grandes similarités avec celle de l'iode. Sur ce principe, les méthodes classiques de marquage utilisées dans le cas de l'iode ont été essayées pour l'astate. L'idée d'utiliser un anticorps marqué à l'astate-211 dans une indication cancérologique est relativement ancienne (1954) mais il a fallu attendre de pouvoir obtenir un couplage suffisamment stable *in vitro* puis *in vivo* pour effectuer la première étude chez l'animal [143].

Les premières tentatives de radio-astatination directe menées sur une protéine de type hémocyanine [144] à partir d'astate oxydé par de la chloramine T, par électrolyse, ou par du peroxyde d'hydrogène ont conduit à de très faibles rendements de marquage associés à une grande instabilité *in vivo* [145]. En effet, contrairement à l'iode qui se fixe directement par substitution électrophile au niveau des résidus tyrosyles ou histidyles des acides aminés dans des conditions oxydantes (modification du degré d'oxydation de l'astate vers une forme électriquement chargée de façon positive), l'astate se fixe, par son caractère métallique, de façon instable au niveau des groupements sulfhydriles des cystéines [146].

L'utilisation des propriétés métalliques de l'astate a permis de coupler l'astate au sein de complexes à base de diéthylène triamine pentaacétate (DTPA) préalablement fixé sur la structure protéique [147] d'un anticorps monoclonal. Cette approche originale s'est néanmoins conclue par un échec avec une déastatination *in vivo* de l'anticorps accompagnée d'une fixation physiologique de l'astate libre au niveau de la thyroïde [148].

Afin de pallier cette instabilité, il a été possible, tout comme pour l'iode de procéder à un marquage indirect en utilisant un groupement prosthétique (synthon organique) bifonctionnel possédant un site d'astatination et un site d'ancrage pouvant réagir sur des groupes résiduels d'acides aminés. Cette méthode de marquage en deux étapes permet d'obtenir des molécules organiques d'astate par des réactions semblables à celles qui sont obtenues dans le chapitre précédent.

Le premier groupement prosthétique utilisé pour marquer une protéine (BSA) avec de l'astate est un dérivé de l'acide para-astatobenzoïque obtenu par substitution nucléophile d'un sel de diazonium [149] qu'il est possible de coupler à la protéine dans un second temps par une réaction d'acylation (Figure n°34). L'utilisation de cette méthode a permis de radiomarquer de façon stable *in vivo* [150] des protéines comme la concanavalin A [151] ou des immunoglobulines [152]. Cette réaction de couplage présente néanmoins les limites inhérentes à l'utilisation des sels de diazonium [102] vues au chapitre précédent.

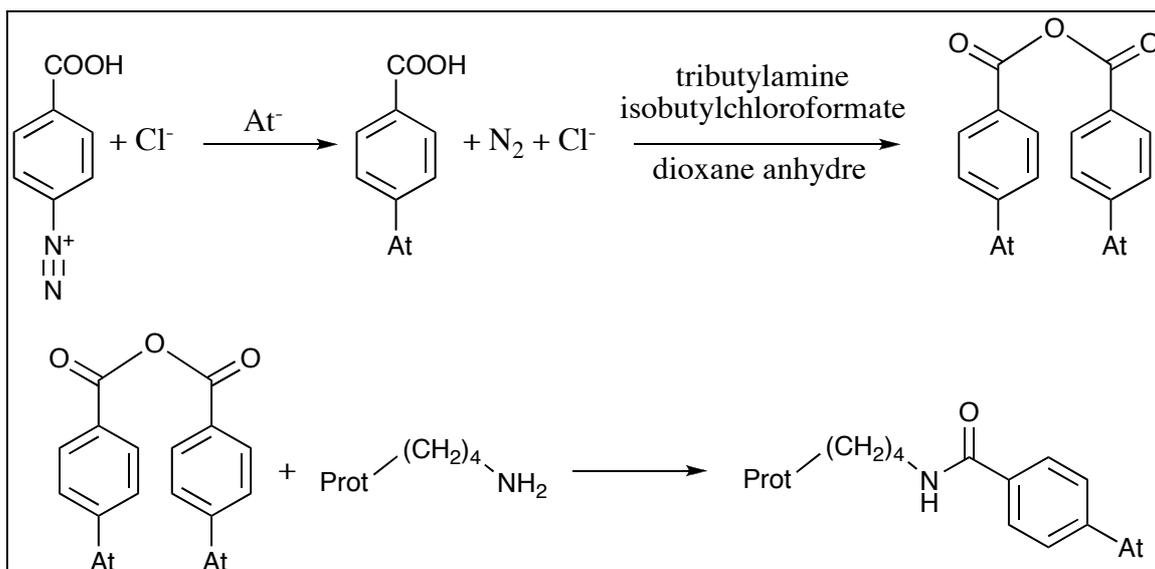


Figure n°34 : Marquage d'une protéine en 2 étapes à l'astate-211 par l'intermédiaire d'un sel de diazonium.

Afin de contourner les limites des diazoniums, il a été mis au point une autre méthode indirecte de radiomarquage de protéine à l'astate permettant d'obtenir le même synthon organique d'acide astato-benzoïque. Cette méthode repose sur une réaction de substitution électrophile d'un groupement métallique partant. Le premier essai de marquage d'un groupement prosthétique par démétallation fut conduit avec un ester activé de l'étain (ATE : *Activated Tin Ester*) de type tri-n-butylstannyl [153]. Cette réaction nécessite dans un premier temps d'oxyder l'astate sous un degré d'oxydation +I (At^+) permettant l'attaque électrophile du métal (Figure n°35). Les divers essais d'optimisation de cette étape sont référencés dans le tableau n°17.

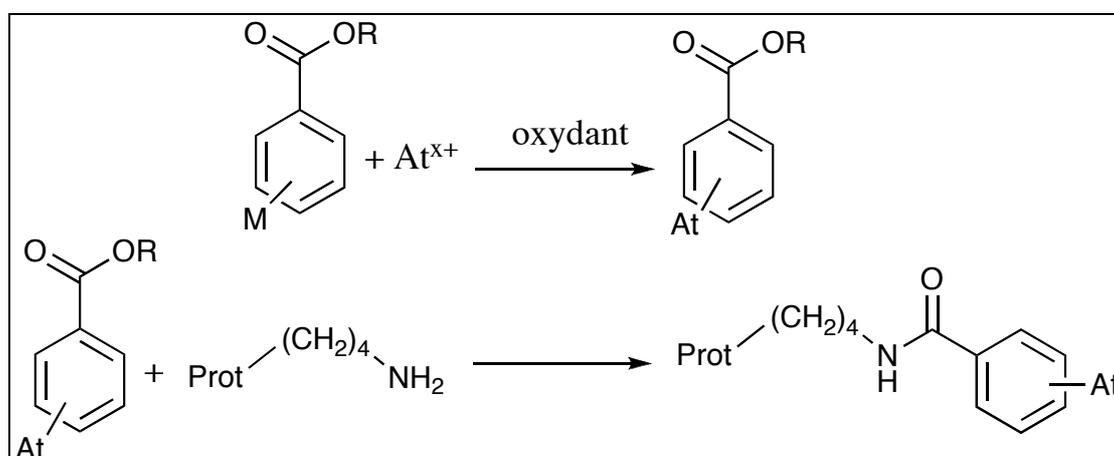


Figure n°35 : Marquage d'une protéine en 2 étapes à l'astate-211 par l'intermédiaire d'une réaction de démétallation électrophile.

Tableau n°17 : Optimisation de la réaction de démétallation électrophile.

M	R	Oxydant	Rendement	Référence
Tri-n-butylstannyl	N-succinimidyl	TBHP	67 %	[153, 154]
Mercuric chloride	Methyl	NCS	74 %	[155]
Tri-n-butylstannyl	Methyl	NCS	80 %	[155]
Tri-n-butylstannyl	N-succinimidyl	NCS	55-80 %	[155]
Pentafluoro silicate	Méthyl	NCS	80 %	[155]
Tri-n-methylstannyl	N-succinimidyl	TBHP	86 %	[156]

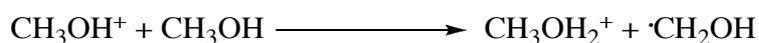
TBHP : t-butylhydroxyperoxyde ; NCS : N-chlorosuccinimide

L'analyse de cette voie réactionnelle de démétallation démontre qu'il s'agit d'une méthode de choix dans l'optique d'un couplage ultérieur à une structure protéique de nature variée (IgG complète et fragments de type F(ab')₂ et ScFv). L'utilisation de l'acide para-astatobenzoïque comme groupement prosthétique permet de conserver l'immunoréactivité de l'anticorps radiomarqué à l'astate (> 80 - 90 %) [157, 156] avec une bonne stabilité *in vivo* (faible quantité d'astate relargué par déhalogénéation se fixant préférentiellement au niveau de la thyroïde ou de l'estomac).

Les deux organométalliques les plus utilisés dans la littérature sont les dérivés tri-butyl et tri-méthyl étain. Pour des raisons de moindre lipophilie et par conséquent de moindre neurotoxicité, les dérivés tri-méthyl étain semblent préférables [158].

Différents essais d'optimisation de ce marquage ont permis de déterminer le solvant préférentiel pour conduire la réaction de substitution électrophile aromatique d'un groupement organo-métallique de type tri-méthyl et tri-butyl stannyl [159]. Ces deux précurseurs présentent la même stabilité vis-à-vis de la dégradation radiolytique du solvant. Dans un solvant halogéné (chloroforme), on observe le relargage de chlore (pour une exposition de 644 Gy) qui peut réagir sur le précurseur en donnant l'ester activé N-succinimidyl-chlorobenzoate. En revanche, dans un solvant moins sensible aux rayonnements ionisants (benzène ou méthanol), il n'est observé qu'une faible dégradation du précurseur. Il est à noter que l'ajout d'acide acétique à la concentration de 0,67 mol/L au méthanol permet d'obtenir une stabilité identique à celle observée dans du benzène qui est un solvant stable sous radiolyse. Ainsi, pour des raisons évidentes de toxicité de solvants, le solvant de prédilection pour conduire ce type de réaction d'halogénéation sera constitué d'un mélange méthanol / acide acétique 95:5. Néanmoins, si le méthanol apparaît comme le solvant de choix, il faut tout de même tenir compte du fait qu'il peut être dégradé sous

radiolyse (effet dose dépendant) avec formation d'entités oxydantes ou réductrices (radicaux libres) pouvant interagir avec la réaction d'astatination [160] :



Des études ultérieures [161] ont permis de démontrer que cette modification du solvant sous radiolyse (3630 Gy) conduit avec un effet dose et temps dépendant (58 MBq d'²¹¹At dans 750 µL de méthanol/acide acétique 95 :5 pendant 21,5 heures) à l'apparition de deux degrés d'oxydation différents d'astate. Il n'a pas été possible d'identifier ces deux formes d'astate. Cependant, il a été remarqué que la disparition de la première des 2 formes est corrélée avec l'augmentation de la dose de radiolyse et que cette diminution est elle même corrélée avec la diminution de rendement de production du succinimidyl astatobenzoate (SAB). Cette forme est vraisemblablement la forme At⁺ réactive dans le cas de la synthèse du SAB. La seconde forme d'astate qui se forme d'autant plus que la radiolyse est importante est une forme vraisemblablement réduite de At⁺ se trouvant sous forme d'un complexe chargé négativement d'après sa mobilité électrophorétique (présence de CH₃OH₂⁺ et pH acide augmente la formation d'espèce réductrice dans le méthanol).

La principale cause de dégradation *in vivo* d'un anticorps marqué à l'astate via un groupement prosthétique de type SAB est essentiellement une cause enzymatique de déhalogénéation [162, 163]. Après métabolisation des anticorps (notamment au niveau hépatique), on retrouve au niveau de la circulation générale (Figure n°36), par analogie à l'iode [156], des dérivés radioactifs du type astate libre, acide astatobenzoïque et dérivés de conjugaison hépatique (acide astatohippurique, astatobenzoylglucuronide) [164, 165].

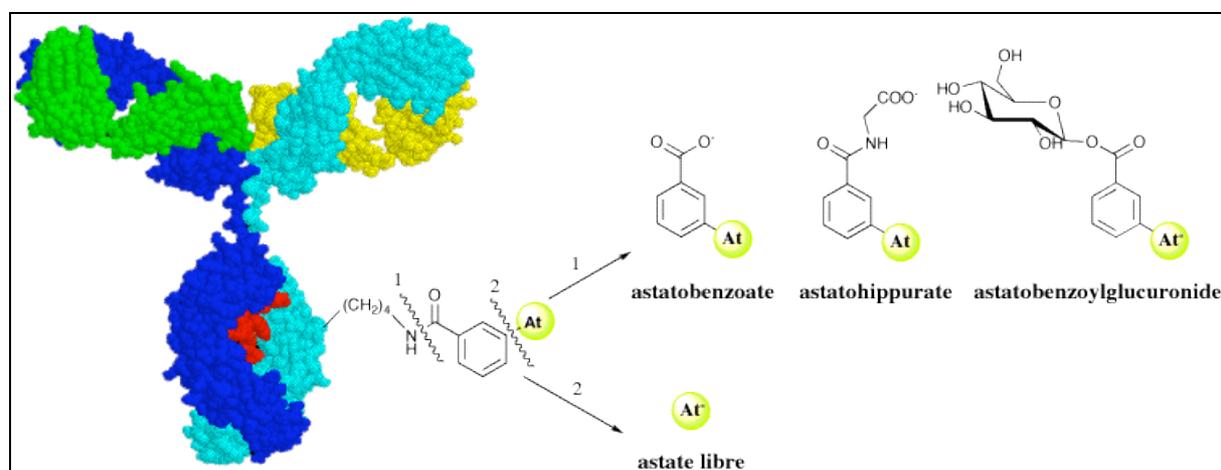


Figure n°36 : Métabolites radiomarqués à l'astate-211 retrouvés dans la circulation générale. (par analogie aux formes iodés).

L'acide astatobenzoïque et ses dérivés (astatohippurate et astatobenzoylglucuronide) sont éliminés par voie urinaire engendrant une irradiation au niveau des reins et de la vessie.

De plus, le métabolisme des anticorps monoclonaux subit une déhalogénéation enzymatique conduisant à la libération d'astate libre s'accumulant au niveau des glandes thyroïdes et de l'estomac. Afin de limiter les effets secondaires dus à cette irradiation des tissus sains, différentes modulations du groupement prosthétique (acide para-astatobenzoïque) ont été tentées (Tableau n°18) afin d'inhiber l'action enzymatique de déhalogénéation et de favoriser une élimination rénale rapide.

Une technique de radio-immunothérapie en 2 temps reposant sur un marquage de la biotine par de l'astate-211 a été réalisée, cette méthode consistait à injecter dans un premier temps un anticorps couplé à de l'avidine. L'injection d'astate-211 couplé à de la biotine (Figure n°37) intervenait dans un second temps [173]. Ce marquage s'est avéré instable *in vivo* chez la souris par libération d'astatoaniline suite à une action de la biotinidase. Des modifications chimiques sur la biotine ont permis de rendre le marquage stable *in vivo* sans qu'aucun essai ultérieur ne soit mené [174].

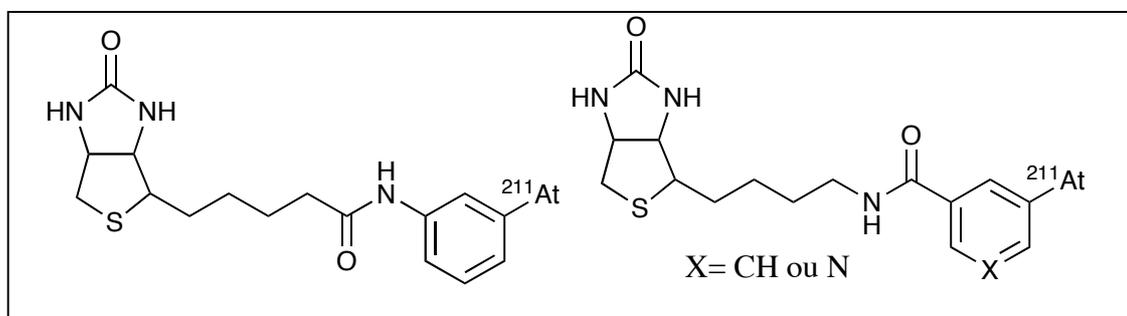


Figure n°37 : Biotine radiomarquée à l'astate-211 (à gauche) et forme résistante à la biotinidase (à droite).

Enfin, l'utilisation de cages de bores de type nido-carborane couplées à des immunoglobulines entières ou à des fragments Fab et F(ab')_2 a permis de démontrer une bonne stabilité *in vivo* comparable à celle du mSAB avec néanmoins l'inconvénient d'une forte fixation hépatique et intestinale des catabolites nido-carborane astate [175, 176].

Tableau n°18 : Groupements prosthétiques utilisés pour marquer des structures protéiques à l'astate-211.

Nom du groupement prosthétique	Formule	Stabilité <i>in vivo</i>	Référence
N-succinimidyl para-astatobenzoïque (<i>p</i> SAB) = Produit de référence		Produit de référence	[155]
N-succinimidyl meta-astatobenzoïque (<i>m</i> SAB)		Légèrement supérieur au <i>p</i> SAB	[166, 157]
N-succinimidyl meta astato pyridine carboxylate (SAPC)		Identique au <i>m</i> SAB en extra cellulaire, supérieur si Ac internalisé	[167, 168]
N-succinimidyl-N-4-astatophenylsuccinamate (SAPS) et methyl-SAPS (R = CH ₃)		Identique au <i>m</i> SAB en extra cellulaire et internalisé. methyl-SAPS semble légèrement plus stable	[169, 170]
N-succinimidyl-astatomethylbenzoate		Identique au <i>m</i> SAB en extra cellulaire et internalisé	[170]
N-succinimidyl-astato-4-guanidinomethylbenzoate		Bonne stabilité pour Ac internalisé	[171]
N-succinimidyl-methoxymethylastatobenzoate et N-succinimidyl-methylthiomethylastatobenzoate		Stabilité inférieure au <i>m</i> SAB	[172]

II.2.7. Résultats des essais pré-cliniques *in vivo* de RIT alpha avec l'astate-211

II.2.7.1. Études d'efficacité

Au niveau de la littérature, on retrouve deux grands principes d'utilisation d'astate-211 en radio-immunothérapie α : l'injection d'immunoglobuline de façon systémique (par voie intra-veineuse le plus souvent) et l'injection de l'immunoglobuline de façon intra-cavitaire.

Injection systémique

L'injection intra-veineuse d'anticorps radiomarqués à l'astate-211 a permis, dans le cas d'une étude chez des primates présentant une allogreffe cardiaque d'éviter le rejet de greffe par utilisation d'un anticorps humanisé anti-Tac (daclizumab, Zenapax[®]) dirigé contre le récepteur de la sous-unité α de l'interleukine-2 situé au niveau des lymphocytes T (antigène CD25) [177]. On observe dans cette étude une augmentation de la médiane de survie chez les singes cynomolgus ayant reçus 0,06 mCi/kg (2,22 MBq/kg) les 2, 4, 7 et 9^{ème} jours (26,7 jours) par rapport au groupe témoin (8,2 jours). Il a été observé chez ces animaux une toxicité médullaire avec leucopénie dont le nadir se situe 14 jours après la greffe. Cette indication de la radio-immunothérapie α présentant de graves effets secondaires par rapport aux traitements conventionnels du rejet de greffe présents sur le marché, l'anticorps daclizumab a été utilisé dans un second temps dans le traitement de la leucémie aigüe à cellules T [178]. Les études de doses maximales tolérées chez l'animal (souris NOD/SCID saine) a démontré la mort de toutes les souris pour une dose de 70 μ Ci (2,59 MBq), la mort de 60 % des souris ayant reçu une dose de 40 μ Ci (1,48 MBq) après 33 jours et la mort de 40 % des souris ayant reçu une dose de 24 μ Ci (888 kBq) après 108 jours. La dose finalement retenue pour cette étude est de 12 μ Ci (444 kBq) chez des souris présentant une xénogreffe issue d'un patient humain porteur d'une leucémie aigüe à cellules T. Le gain en termes de médiane de survie des souris ayant reçues 444 kBq de daclizumab marqué à l'astate-211 est significativement différent par rapport au groupe témoin (respectivement 87 jours contre 60 jours). Cette étude montre également une meilleure survie chez les animaux ayant reçus de façon concomitante une cure d'immunothérapie (daclizumab non radiomarqué) et la radio-immunothérapie α (daclizumab marqué à l'astate-211).

L'utilisation de l'astate-211 en radio-immunothérapie α a également été étudiée dans le traitement de lymphomes à cellules T exprimant l'antigène CD30 (famille des récepteurs du *Tumor Necrosis Factor*). Dans ce cas, l'utilisation d'un anticorps spécifique (HeFi-1)

marqué à l'astate-211 (444 kBq) a permis, chez des souris ayant reçus une xénogreffe humaine de la pathologie une augmentation de la médiane de survie supérieure à celle des groupes ayant reçus un traitement de radio-immunothérapie β^- à l'yttrium-90 (3,7 MBq) et au groupe témoin (respectivement 110, 60 et 30 jours) [179].

Injection intra-cavitaire

Actuellement, 2 types de pathologies cancéreuses ont fait l'objet d'étude de radio-immunothérapie α à l'astate-211 par injection intra-cavitaire. Le gain de ce type de technique est un avantage pharmacocinétique minimisant le temps de circulation de l'anticorps.

La première de ces pathologies est le carcinome ovarien se trouvant dans la cavité naturelle constituée par le péritoine [180]. L'injection de 400 kBq d'anticorps MOv18 (IgG1 spécifique d'une glycoprotéine membranaire reconnaissant les folates qui est surexprimée dans 90 % des cancers ovariens humains) marqué à l'astate-211 à des souris de type BALB/c permet d'observer une augmentation de la médiane de survie (222 jours) par rapport au groupe contrôle (140 jours) [181].

La seconde de ces pathologies est le gliome pour lequel on obtient, après traitement chirurgical une cavité artificielle de résection. L'anticorps 81C6 utilisé dans ce cas est spécifique de la tenascine qui est une protéine surexprimée dans ce cancer du système nerveux central. L'injection intra-técale de 12 μ Ci (444 kBq) de cet anticorps à des rats atteints de cette pathologie permet une augmentation de la survie de 113 %. L'absence de la pathologie initiale est observée après sacrifice à 300 jours sur 6 des 10 rats ayant reçus 18 μ Ci (666 kBq) [65].

II.2.7.2. Etudes toxicologiques

Les études toxicologiques ont été effectuées chez des souris de type B6C3F₁ âgées de 3 à 4 semaines et pesant de 18 à 20 g pour les 8 femelles et de 20 à 22 g pour les 8 mâles. 16 souris sont injectées avec différentes activités (de 0 à 110 kBq/g) d'une immunoglobuline entière (81C6) marquée à l'astate-211 et les résultats obtenus sont les suivants [182] :

- La dose létale 10 (LD₁₀) estimée lors de cette étude est 46 kBq/g chez les femelles et de 102 kBq/g chez les mâles,
- Les animaux ayant reçus les doses de 110 kBq/g présentent tous une aplasie médullaire, la majorité des souris présente une atrophie splénique, des modifications anatomo-pathologiques de l'estomac et des atrophies testiculaires pour les mâles,

- Pour les doses inférieures, on retrouve des fibroses peri-vasculaires et cardiaques pour tous les groupes ayant reçus de 17 à 83 kBq/g (avec une apparition plus fréquente de ce type de fibrose chez les femelles),
- Pas de différences significatives par rapport au groupe témoin pour les pathologies thyroïdiennes,
- Apparition de différentes pathologies néoplasiques après un an de suivi : carcinome papillaire thyroïdien (1 femelle), carcinome rénal (1 mâle), carcinome pulmonaire (1 femelle et 2 mâles), carcinome ovarien (1 femelle).

Une étude toxicologique ultérieure a démontré dans le cas d'un anticorps spécifique de l'antigène CD45 (utilisable en radio-immunothérapie α dans un but de myelosuppression préalable à une greffe de moelle osseuse) les mêmes atteintes toxicologiques que l'étude précédente avec des atteintes supplémentaires au niveau hépatique (augmentation des transaminases) et rénal (augmentation de la créatinine sanguine) [183].

II.2.7.3. Études de biodistribution

La biodistribution des anticorps radiomarqués à l'astate-211 injectés par voie intraveineuse est classique et similaire à celle déjà bien décrite des anticorps radiomarqués à l'iode (Figure n°38).

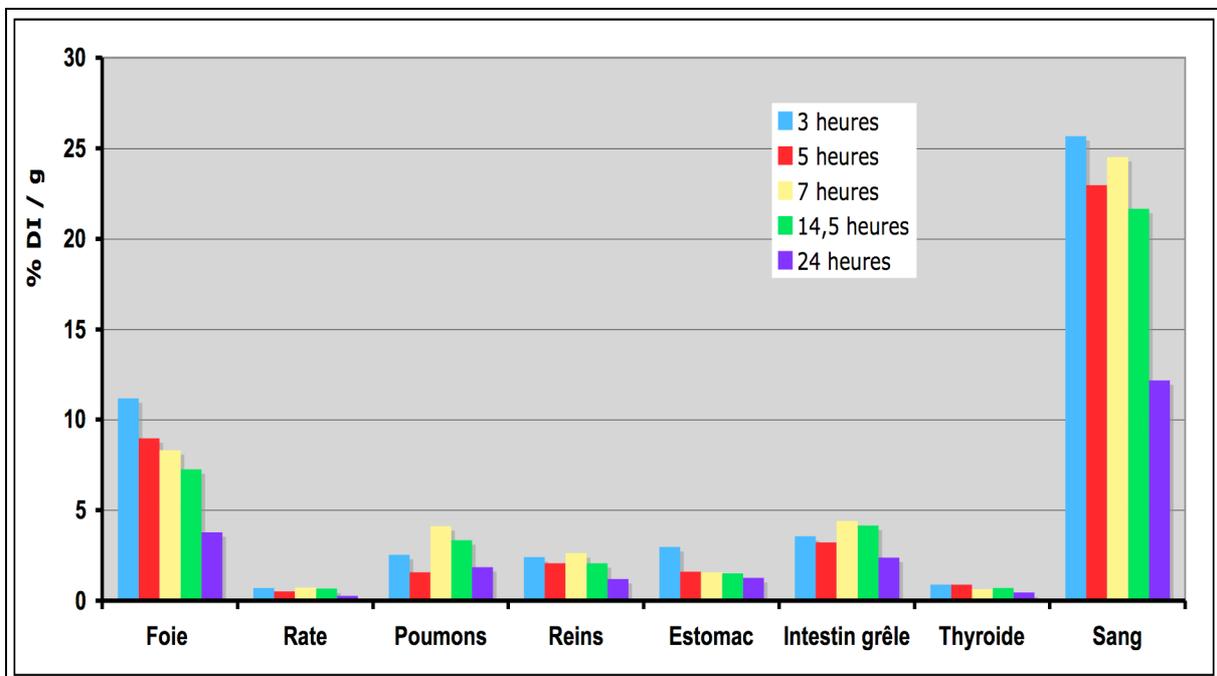


Figure n°38 : Biodistribution d'une IgG entière marquée à l'astate-211 à 3 heures, 5 heures, 7 heures, 14,5 heures et 24 heures exprimée en pourcentage de dose injectée par gramme d'organe [156].

Cette biodistribution présente chez des souris de type BALB/c une cinétique d'élimination sanguine relativement lente ainsi qu'un métabolisme hépatique et pulmonaire engendrant des métabolites éliminés par voie rénale. De plus, on observe que la fixation thyroïdienne et stomacale est relativement faible révélant une très bonne stabilité de la liaison carbone-astate.

La biodistribution de fragments $F(ab')_2$ chez le même type de souris (Figure n°39) révèle une élimination sanguine plus rapide avec une moindre fixation hépatique et une plus grande fixation rénale. Dans ce cas, on observe une plus grande fixation hépatique signe d'une légère instabilité *in vivo* de la liaison carbone-astate (la fixation thyroïdienne reste faible dans ce cas).

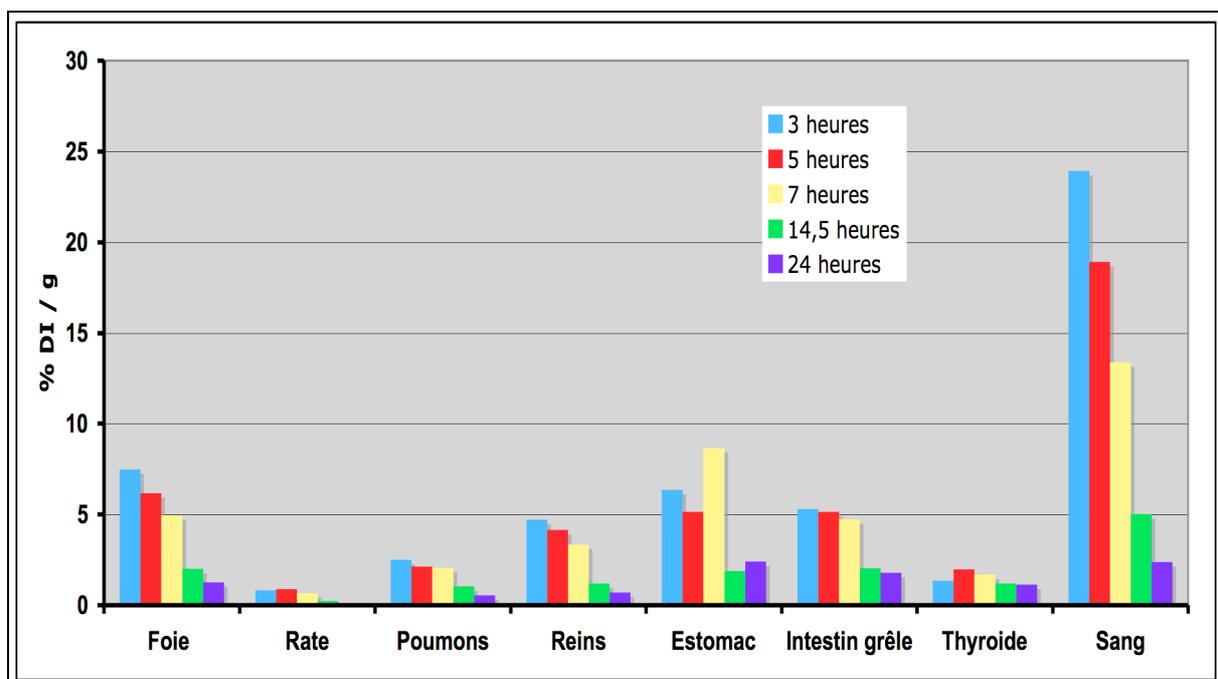


Figure n°39 : Biodistribution de fragments $F(ab')_2$ marqués à l'astate-211 à 3 heures, 5 heures, 7 heures, 14,5 heures et 24 heures exprimée en pourcentage de dose injectée par gramme d'organe [156].

Dans le cas d'animaux ayant subis une xénogreffe tumorale, on observe une accumulation progressive (Figure n°40) de la radioactivité au niveau de la tumeur [143] démontrant ainsi, par l'intermédiaire de la fixation de l'immunovecteur, et par la dose engagée sur la cible tumorale la faisabilité *in vivo* de la radio-immunothérapie α à l'astate-211.

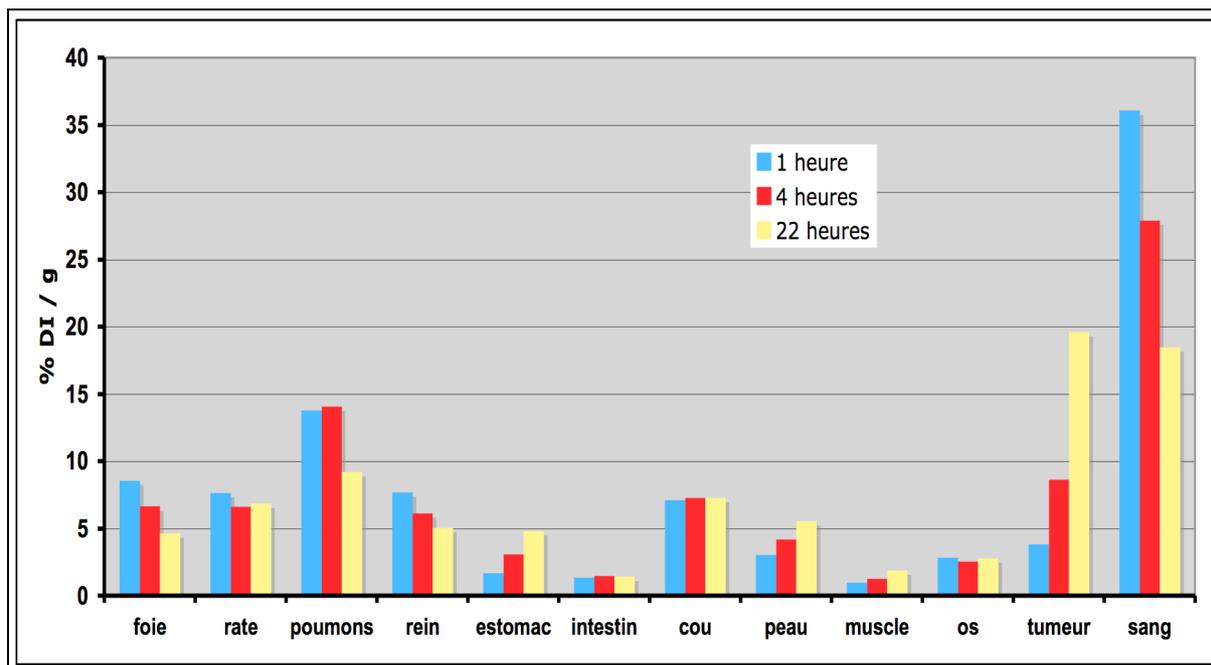


Figure n°40 : Biodistribution d'IgG spécifique d'une tumeur marquée à l'astate-211 à 1 heure, 4 heures et 22 heures exprimée en pourcentage de dose injectée par gramme d'organe chez une souris porteuse de mélanome.

Ce type de profil de biodistribution est retrouvé dans le cas d'injection intra-péritonéale avec une fixation supplémentaire au niveau de la graisse intra-péritonéale [180].

Dans le cas d'une injection dans la cavité de résection chirurgicale d'un gliome, il n'est pas observé de circulation de l'IgG et 96,7 % de l'activité décroît dans la cavité d'exérèse chirurgicale [87].

II.2.8. Essais cliniques de RIT alpha à l'astate-211

Le seul essai clinique de radio-immunothérapie alpha mené à ce jour [184] avec de l'astate-211 utilise un anticorps monoclonal chimérique de type IgG2b dirigé contre la tenascine qui est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire surexprimé dans les tumeurs malignes du système nerveux central de type gliome [65]. Les patients inclus dans cet essai sont candidats pour une résection chirurgicale de tumeurs primaires supratentorielles confirmées au niveau histologique. Les patients présentant une brèche méningée post-chirurgicale (contrôle par injection d'albumine ou de DTPA marquée au Tc^{99m}) sont exclus de l'essai. Sur les 18 patients inclus, 14 présentent un glioblastome multiforme, 3 un oligodendrogliome anaplasique et 1 est atteint d'un astrocytome anaplasique. L'ensemble de ces patients reçoivent une prémédication en iodure de potassium et en hormone thyroïdienne (lyothyronine ; Clinomel[®]). Dans le cadre de cet essai

l'anticorps (10 mg) est préalablement couplé à l'astate via un groupement prosthétique de type SAB puis injecté à la dose de 71 à 347 MBq directement dans la cavité de résection chirurgicale de la tumeur [185].

Les patients ayant participé à cet essai clinique ont présenté une médiane globale de survie de 54,1 semaines (contre 31 semaines avec le traitement conventionnel pour cette pathologie). L'essai ainsi mené est nettement encourageant avec 8 patients survivants 1 an après le traitement et 2 patients survivants après 3 ans.

Les études de biodistribution de l'anticorps effectuées par imagerie des émissions X associées à la désintégration de l'astate ont démontré une très bonne rétention de l'ordre de 96,7 % +/- 3,6 % au niveau de la cavité de résection avec une très faible fixation de l'anticorps au niveau du foie, de la rate et de la moelle osseuse et un taux sanguin circulant de l'ordre de 0,05 à 0,25 % de la dose injectée 24 heures après l'injection. Même si cette étude n'a pas été conçue pour une étude des doses limites de toxicité, il n'a pas été observé de toxicité hématologique de grade > 3 (*Common Toxic Criteria version 2.0* [186]) attribuable à la radio-immunothérapie alpha ni d'effets secondaires (neurologiques ou non) directement attribuables à la thérapie.

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre III. Partie expérimentale

III.1. Objectifs du travail de thèse

La radio-immunothérapie a montré son efficacité dans le traitement des lymphomes en utilisant des isotopes émetteurs de particules β^- , et de nombreuses études ont démontré le potentiel prometteur de l'utilisation de radionucléides émetteurs de particules α dans le traitement de certains types de tumeurs. Parmi les isotopes émetteurs de particules α utilisables en clinique, l'astate-211 semble présenter des propriétés physiques et chimiques particulièrement adaptées à une utilisation thérapeutique.

Afin de pouvoir coupler l'astate-211 à une structure protéique de type immunoglobuline nous avons choisi d'utiliser un groupement prosthétique standard dans la chimie de couplage de l'iode : l'ester 3-(triméthylstannyl)benzoate de N-hydroxysuccinimidyle. Cet ester est une variété d'ester activé d'étain (*Activated Tin Ester*) qui présente la particularité d'être bi-fonctionnel. En effet, cette molécule possède un site (organostannyl) permettant une réaction d'halogéno-déstannylation et un site ester (N-hydroxysuccinimidyle) permettant le couplage à une fonction amine présente sur un résidu lysine de la structure protéique (Figure n°41).

L'objectif principal de ce travail de thèse consiste en la mise au point d'une technique de marquage d'anticorps monoclonaux (ou de ses fragments) avec de l'astate-211 qui est un isotope émetteur de particules alpha en vue de développer une stratégie thérapeutique anti-tumorale de radio-immunothérapie α . Au cours de cette étude, la technique d'irradiation utilisée pour produire l'astate-211 a nécessité l'utilisation de support de cible en cuivre imposant la mise en œuvre d'une technique d'extraction par voie liquide permettant de développer une approche originale dans le couplage d'astate-211 à une structure protéique.

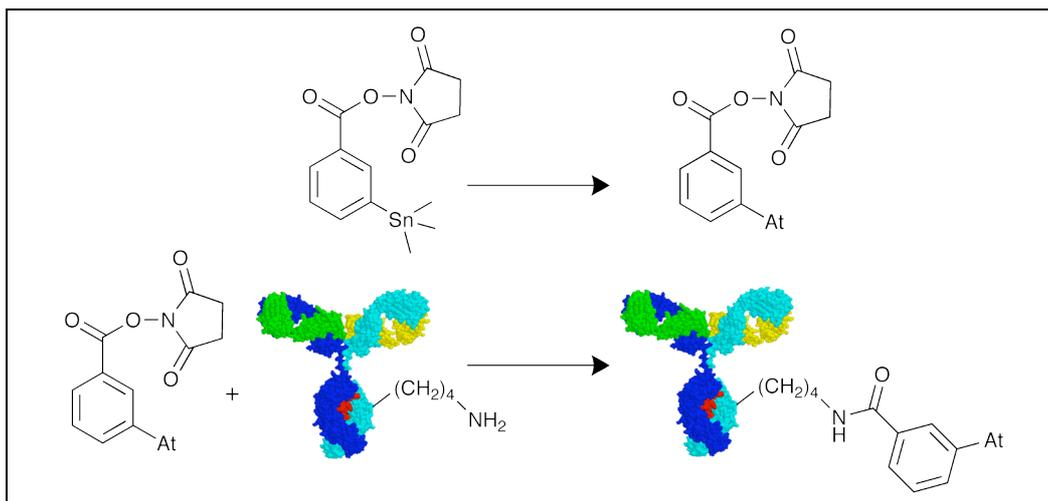


Figure n°41 : Marquage d'anticorps par de l'astate-211 en 2 étapes. En haut : étape n°1 consistant à marquer un groupement prosthétique. En bas : étape n°2 consistant à coupler le groupement prosthétique à l'anticorps.

Ce travail de thèse s'articule en 5 parties dont les principaux objectifs sont les suivants :

1. Extraire l'astate de la cible de façon à obtenir une solution d'astate-211 de qualité convenable. Dans ce travail, nous avons choisi une extraction acide de la cible permettant d'obtenir, de façon répétable, de l'astate-211 avec de bons rendements et une pureté radionucléidique satisfaisante en vue d'une utilisation clinique. L'objectif de ce travail a été de définir les conditions chimiques dans lesquelles l'astate-211 est en solution.

2. Radiomarquer le groupement prosthétique en mettant au point une méthode de marquage simple, rapide et efficace. Pour cela, nous avons cherché à :

- identifier les produits issus du radiomarquage à l'astate à partir de références iodées qui sont plus facilement identifiables de façon chimique,
- optimiser le rendement de marquage du groupement prosthétique en menant une étude paramétrique des différentes conditions du marquage.

3. Coupler le groupement prosthétique marqué à l'astate-211 à une structure protéique. Le but de cet partie est d'obtenir un anticorps radiomarqué à l'astate-211 avec une pureté radiochimique et une activité spécifique compatible avec une utilisation clinique de radio-immunothérapie α .

4. Tester *in vitro* les anticorps radiomarqués à l'astate-211 avant d'envisager leur utilisation chez l'animal. Dans ce but, nous avons mis au point :

- des tests de stabilités sériques pour connaître la stabilité du couplage astate-anticorps dans un milieu biologique (sérum humain à 37°C),
- des tests d'immunoréactivités pour évaluer la capacité de reconnaissance de l'anticorps monoclonal vis à vis de son antigène spécifique.

5. Etudier ce système sur un modèle animal. L'objectif étant de connaître la pharmacocinétique et la biodistribution des anticorps marqués à l'astate-211 *in vivo* dans un modèle murin.

L'ensemble de ce projet de thèse est multidisciplinaire dans la mesure où il nécessite des compétences différentes en chimie, radiopharmacie, immunologie et médecine nucléaire, chacune présentant ses propres caractéristiques et limites. C'est pourquoi chaque partie a été traitée séparément sous la forme « introduction, matériels et méthodes, résultats, discussion » pour permettre de la restituer dans son contexte. Une discussion générale effectuée ensuite la synthèse des résultats obtenus dans chaque domaine, en comparaison avec les résultats observés dans la littérature.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de recherche du Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers unité INSERM U892 à Nantes. Pour la mise au point de l'extraction des cibles d'astate-211, le travail a été fait en collaboration avec le laboratoire Subatech de l'École des Mines de Nantes.

III.2. Extraction de l'astate

III.2.1. Introduction

La cible d'astate-211 est obtenue au cyclotron CNRS-CEMHTI d'Orléans (France) via la réaction classique d'irradiation $^{209}\text{Bi} (\alpha, 2n) ^{211}\text{At}$. (Figure n°42). Le support de cible utilisé est un support en cuivre qui est imposé par les caractéristiques techniques de refroidissement du cyclotron.

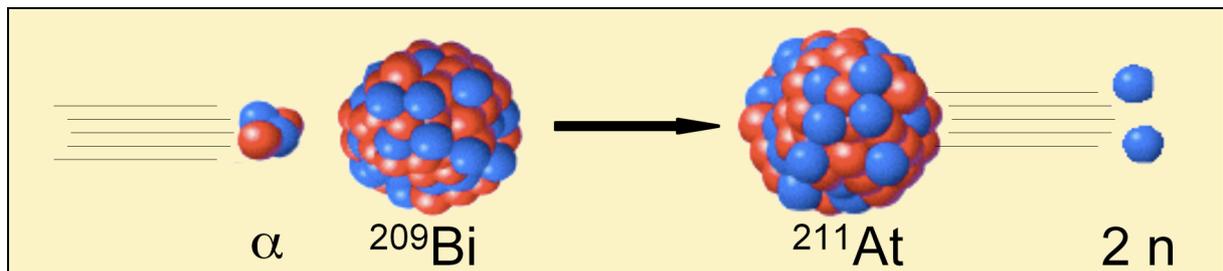


Figure n°42 : Réaction nucléaire de production d'astate-211 : $^{209}\text{Bi} (\alpha, 2n) ^{211}\text{At}$.

La cible solide servant à produire l'astate-211 est obtenue par fusion d'un excès de bismuth-209 pur à 99,999 % (Goodfellow, Cambridge – Royaume Uni) sur un support de cuivre (Figure n°43). Cette méthodologie permet d'obtenir une couche homogène de bismuth-209 de 240 μm d'épaisseur.

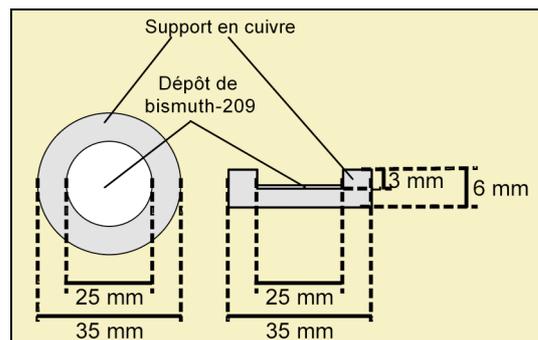


Figure n°43 : Paramètres de la cible solide de bismuth-209 (support en cuivre).

Les paramètres faisceaux permettant d'obtenir l'astate-211 sont :

- énergie des particules alpha : 28 MeV,
- intensité moyenne du faisceau : 2 μA ,
- temps d'irradiation : 2 heures.

À l'issue de cette réaction d'irradiation, l'activité moyenne produite en astate-211 est d'environ 100 MBq.

Le but de la manipulation d'extraction est d'obtenir de façon simple, rapide et répétable une solution d'astate-211 présentant une bonne activité volumique et une bonne pureté radionucléidique avec un bon rendement d'extraction. Afin de parvenir à ce résultat, une méthode d'extraction liquide par attaque de la cible a été mise au point en partenariat avec le laboratoire Subatech de l'Ecole des Mines de Nantes [187]. Le choix de l'utilisation de cette méthode pour ce travail de thèse repose sur le fait qu'elle permette, avec un faible investissement matériel, d'obtenir de l'astate-211 avec une grande pureté radionucléidique et avec un haut rendement [188]. Il est à noter que si cette méthode a déjà été décrite dans la littérature, elle n'a jamais permis d'aller jusqu'au marquage d'anticorps monoclonaux [89].

III.2.2. Matériels et méthodes

III.2.2.1. Matières premières

L'acide nitrique 65% et le di-isopropylether (DIPE) sont des produits de la société Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne).

La cible d'astate-211 est produite par le cyclotron CNRS-CEMHTI d'Orléans (France) pendant 2 heures d'irradiation sur un créneau horaire 7h30 – 9h30 puis est transportée par voie routière jusqu'à Nantes où elle est disponible au laboratoire INSERM U892 à partir de 14h00.

III.2.2.2. Attaque acide de la cible

La cible est déposée dans un bécher de 100 mL et 500 μ L d'acide nitrique 65 % sont déposés au centre de la cible. Après 10 minutes de réaction durant lesquelles on observe un abondant dégagement de vapeur nitreuse de couleur marron, l'acide nitrique est prélevé puis mis à évaporer à sec dans un tube à hémolyse placé dans un bloc chauffant (150°C). L'opération est pratiquée à 6 reprises. Après chaque attaque acide de la cible, la fraction nitrée est ajoutée au résidu sec de la précédente attaque. Après évaporation à sec des 4 fractions acides, le résidu est repris par 3 mL d'acide nitrique commercial 65% dilué au demi (32,5 %). Ces 3 mL d'acide nitrique 32,5 % contenant l'astate-211 sont extraits par 2 fois 500 μ L de di-isopropylether (Figure n°44). Le premier extrait sert aux marquages pratiqués à l'INSERM et le second extrait sert aux manipulations pratiquées par le laboratoire Subatech

de l'Ecole des Mines de Nantes. Une estimation du rendement d'extraction est effectuée de façon relative par mesure de l'activité de la cible dans une chambre d'ionisation de type ACAD 2000 de la société Lemer Pax (Carquefou – France) non calibrée pour l'astate-211.

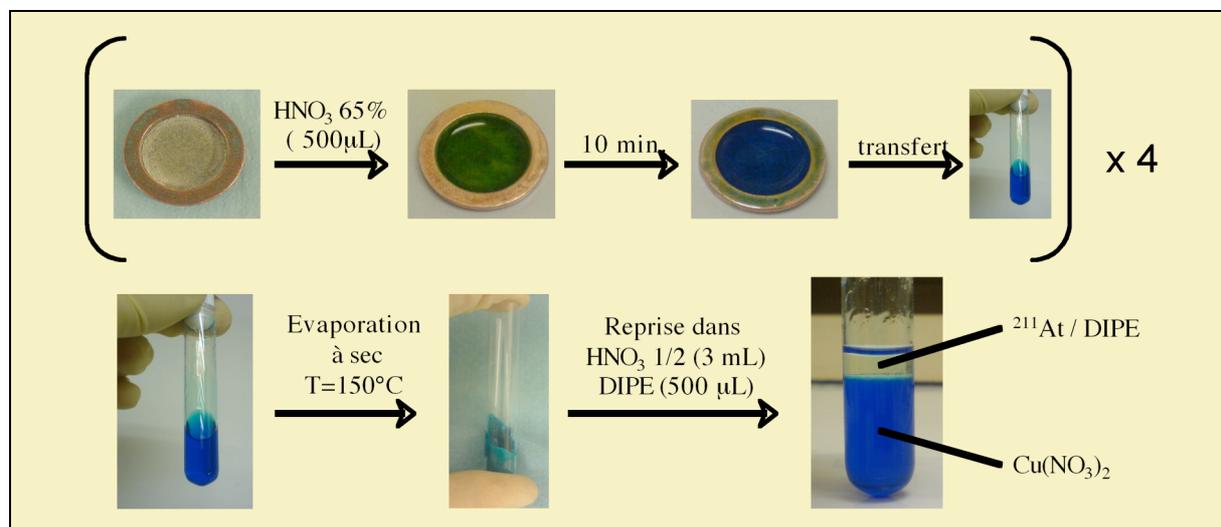


Figure n°44 : Extraction liquide d'astate-211 par attaque acide et extraction organique.

La pureté radionucléidique de l'astate-211 ainsi extrait est déterminée par spectrométrie gamma de scintillation NaI(Tl) sur un appareil fourni par la société Raytest (Straubenhardt, Allemagne).

III.2.2.3. Titration de l'acide nitrique dans la phase organique

Pour déterminer la concentration molaire en acide nitrique contenue dans la phase organique de di-isopropylether après extraction on effectue une réaction d'extraction à blanc (3 mL d'acide nitrique 32,5 % + 500 µL de di-isopropylether) que l'on titre par acidimétrie à la soude 1,0 N en présence de bleu de bromothymol (BBT) comme indicateur coloré (zone de virage : pH = 6,0 - 7,6).

III.2.2.4. Evolution de l'astate dans la phase organique

Afin d'affiner la connaissance de la spéciation sous laquelle se trouve l'astate-211 dans la solution d'extraction, on dépose 2 µL de la solution d'extraction à différents temps (t_0 , $t_{30\text{min}}$, $t_{2\text{h}}$ et $t_{12\text{h}}$) sur une chromatographie sur couche mince dont la phase stationnaire est composée de silice de type Silica gel 60 F₂₅₄ de la société Merck (Darmstadt - Allemagne) et la phase mobile d'un mélange apolaire chloroforme/acétate d'éthyle 8:2. Les chromatographies sont révélées et analysées sur phosphorimager Typhoon-GE Healthcare

(Orsay – France). Ces différents paramètres chromatographiques ainsi que leurs résultats serviront de références lors des utilisations ultérieures de l'astate-211.

III.2.3. Résultats et discussion

III.2.3.1. Extraction de l'astate

Comme nous l'avons vu lors de l'étude des propriétés chimiques de l'astate, cet élément est solubilisé à pH acide et il est possible de l'extraire à ce pH par des solvants organiques de type dibutylether ou di-isopropylether [107, 189, 187]. L'attaque de la cible en cuivre par de l'acide nitrique conduit à une dissolution du support sous forme de nitrate de cuivre de couleur bleue intense.

La figure n°45 représente l'évolution de l'activité en pourcentage contenu sur la cible en fonction du nombre d'attaque acide.

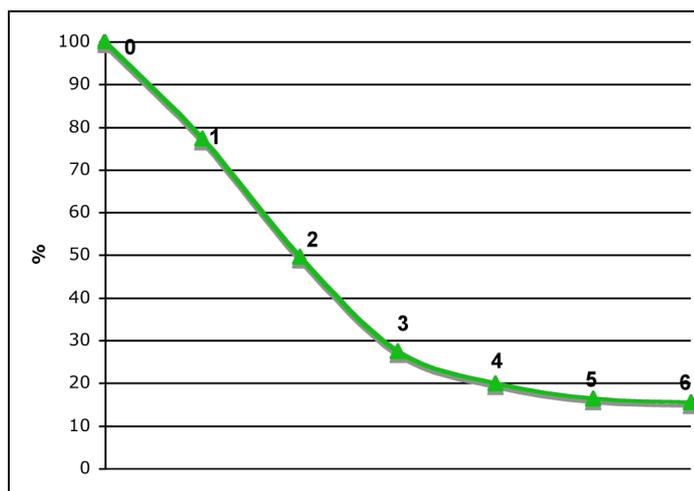


Figure n°45 : Evolution en % de l'activité résiduelle sur la cible ; 0 activité à réception ; 1,2,3,4,5 et 6 activités après attaques acides successives (les résultats tiennent compte de la décroissance de l'astate-211).

Il semble qu'un nombre de 4 attaques acide corresponde à un optimum en termes de rendement d'extraction (80 %) de l'activité totale de la cible. De plus, l'étude spectrale des radionucléides présents dans les 20 % de l'activité restante contient majoritairement des impuretés radionucléidiques issues notamment de l'activation du cuivre (gallium-67, zinc-65, et en moindre mesure bismuth-207 et indium-111). L'activité totale (environ 60 MBq) récupérée en 2 extractions de 500 μ L par du di-isopropylether correspond à 91 % de l'activité théoriquement récupérable sur la cible après décroissance durant le transport Orléans-Nantes (4 h 30).

Le choix du di-isopropylether comme solvant d'extraction a été effectué par le laboratoire Subatech de l'Ecole des Mines de Nantes et repose sur la polarité de ce solvant, sa moindre température d'ébullition (68°C contre 142°C pour le dibutylether) ainsi que de la présence de 2 doublets d'électrons non-liant permettant la complexation de l'astate sous une forme [187] :



L'extraction d'acide nitrique par le di-isopropylether est un inconvénient qui n'est pas rencontré avec d'autres acides comme l'acide chlorhydrique ou l'acide perchlorique. Néanmoins, l'utilisation de l'acide nitrique permet de minimiser l'extraction d'impuretés radionucléidiques issues de l'activation du cuivre (notamment gallium-67 et zinc-65).

Le choix d'un volume de 500 μL pour la contre-extraction de l'astate-211 depuis la solution d'acide nitrique est basé sur le fait que le prélèvement s'effectue à l'aide d'une micro-pipette et qu'il semble, pour des raisons d'aisance de prélèvement après décantation ainsi que d'optimisation de l'activité volumique, le plus approprié. L'activité contenue dans le premier extrait de di-isopropylether est de 48 MBq dans 500 μL et l'activité contenue dans le second extrait de di-isopropylether est de 11 MBq dans 500 μL . L'activité correspondante en astate-211 qui est extraite de la cible est donc de 57 MBq en 1h15 d'extraction liquide. Le rendement d'extraction dans le di-isopropylether depuis la phase acide nitrique est supérieur à 97 %.

Le spectre réalisé montre les pics caractéristiques de l'astate-211 et de ses produits de décroissance (pic majoritaire de la raie $K\alpha$ du polonium à 70-92 keV et pics à 570, 687, 898 et 1064 keV). A réception, pour 57 MBq d'astate-211, on trouve au niveau des impuretés radionucléidiques présentes au niveau de la cible environ 40 kBq de gallium-67, 200 Bq d'indium-111, 170 Bq de bismuth-207 et 1400 Bq de zinc-65 (spectroscopie germanium réalisée au niveau du laboratoire Subatech de l'Ecole de Mines de Nantes). Après contre-extraction par le di-isopropylether, les impuretés ne sont plus détectables et seuls les pics caractéristiques de l'astate sont visibles.

Les analyses par ICP-MS (*inductively coupled plasma – mass spectrometry*) réalisées par le laboratoire Subatech de l'Ecole de Mines de Nantes ont démontré une forte teneur en cuivre au niveau de la phase nitrique et une absence de métaux au niveau de la phase di-isopropylether.

III.2.3.2. Titrimétrie de l'acide nitrique

Tous les essais sont réalisés sur 500 μL de solution à titrer, les résultats sont référencés dans le tableau n°19.

Tableau n°19 : Titrimétrie acide de la solution de di-isopropylether d'extraction.

Solution analysée	Concentration H_3O^+ théorique	Volume de soude 1 M ajoutée	Concentration H_3O^+
Acide nitrique commercial 65 %	14,34 M	7,25 mL	14,50 M
Acide nitrique 32,5 %	7,25 M	3,65 mL	7,30 M
di-isopropylether	/	1,55 mL	3,10 M

De plus, parallèlement à ce passage de H_3O^+ dans la phase organique, on observe une augmentation de la densité (500 μL de di-isopropylether non extrait par de l'acide nitrique 32,5 % pèse 0,362 g alors que le même volume de phase organique contacté par l'acide nitrique 32,5 % pèse 0,448 g) consécutive à une miscibilité de l'eau dans le di-isopropylether ayant pour conséquence une augmentation de volume d'environ 130 % durant l'extraction de l'astate. Ce passage d'acide nitrique est très important car il pourra avoir différentes conséquences sur la forme chimique de l'astate extrait, sur son évolution cinétique (propriétés oxydantes de l'acide nitrique) et sur le couplage ultérieur à une structure protéique ne supportant pas des pH trop acides.

III.2.3.3. Evolution de l'astate en phase organique

L'acide nitrique étant un oxydant puissant, nous avons observé une modification de la forme chimique sous laquelle se trouve l'astate-211 dans la phase di-isopropylether au cours du temps. La répartition de la radioactivité sur les plaques de chromatographie est variable selon le temps (Figure n°46). A t_0 , on trouve 69,3 % de la radioactivité au niveau du point de dépôt ($R_f = 0$) et les 30,7 % restant de l'activité se trouve au niveau du front de solvant ($R_f = 1$). Après 30 minutes d'attente, la répartition radiochromatographique de présente une répartition avec 58,5 % de l'astate-211 au point de dépôt et 41,5 % au front de solvant. Cette modification de la répartition des formes d'astate s'accroît après 2 heures avec 9,5 % de l'activité au point de dépôt et 90,5 % au front de solvant. Cette répartition atteinte après 2

heures semble stable dans la mesure où elle est retrouvée 12 heures après l'extraction (8,5 % au point de dépôt et 91,5 % au front de solvant).

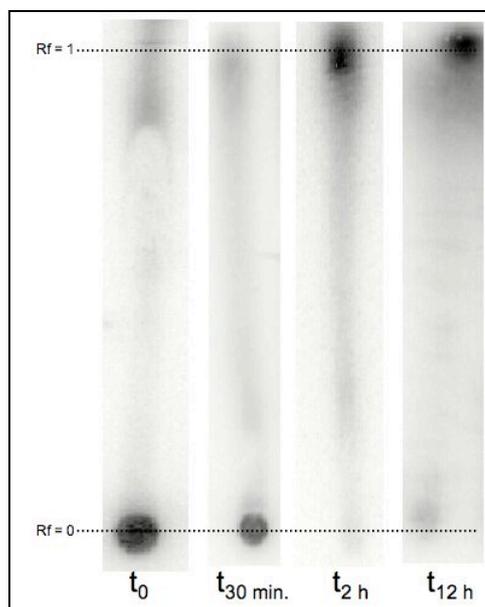


Figure n°46 : Evolution de la polarité des formes d'astate-211 dans le di-isopropylether en fonction du temps après l'extraction.

Cette étude a permis de démontrer que la forme chimique sous laquelle l'astate est extrait n'est pas stable dans le temps. Cette évolution démontre un changement de polarité depuis une forme polaire ne migrant pas dans le système chromatographique utilisé à une forme apolaire migrant avec le solvant. Les deux raisons les plus probables pouvant être à l'origine de cette modification chimique de l'astate sont vraisemblablement une variation cinétiquement lente de la forme et/ou une modification du degré d'oxydation de l'astate consécutive à un changement du milieu sous radiolyse. Cette observation pourra avoir plusieurs conséquences sur notre étude ultérieure de radiomarquage d'un groupement prosthétique à l'astate-211. En effet, il faudra déterminer si le marquage doit être réalisé immédiatement après l'extraction de la cible, si la contre extraction de l'acide nitrique peut être réalisée et si un ajout d'agent oxydant dans le milieu réactionnel (en plus de l'acide nitrique) s'avère nécessaire.

En conclusion, cette technique d'extraction nous permet, de façon répétable, d'obtenir 90 % de l'astate-211 présent sur la cible en 1h15 de manipulation sous une forme polaire (électriquement chargée) évoluant vraisemblablement vers une forme complexée apolaire de type $[At_x(NO_3^-)(DIPE)]$ [187]. La solution ainsi récupérée occupe un volume de 650 μ L (500 μ L de di-isopropylether et environ 150 μ L de phase aqueuse) avec un pH très acide ($[H_3O^+] = 3,1 \text{ mol/L}$) que l'on ne pourra pas négliger lors de l'utilisation de cette solution en vue d'un couplage protéique.

III.3. Marquage du précurseur stannique

III.3.1. Introduction

L'introduction d'astate-211 sur une structure protéique de type immunoglobuline s'effectue en 2 étapes par l'intermédiaire d'une molécule présentant une fonction organométallique de type stannique permettant dans une première étape la réaction d'halogéno-destannylation et un ester activé de type N-hydroxysuccinimide (NHS) permettant le couplage à une protéine dans un second temps (Figure n°47).

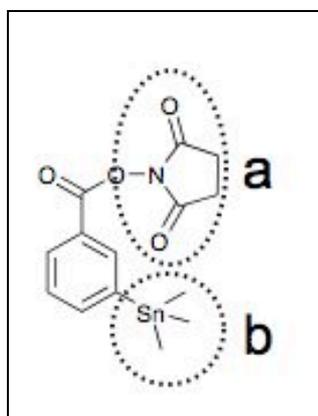


Figure n°47 : Ester d'étain activé bifonctionnel. a. fonction ester activé de N-hydroxysuccinimide permettant le couplage protéique. b. fonction triméthylstannyl permettant le marquage à l'astate-211 par destannylation électrophile.

Le groupement prosthétique retenu pour ce travail de thèse est l'ester 3-(triméthylstannyl)benzoate de N-hydroxysuccinimide qui présente des rendements de synthèse organique favorables, donne des rendements de radiomarquage élevés lors de couplage à des anticorps et présente une bonne stabilité de marquage. On retrouve dans la littérature de nombreux cas de marquages de protéines à l'astate-211 avec ce synthon organique mais aucune étude d'optimisation n'a réellement été menée et ce marquage ne s'est pas avéré réalisable jusqu'à maintenant lors de l'utilisation d'astate extrait par voie liquide (attaque acide de la cible).

Afin d'étudier les différents paramètres de ce couplage, nous nous sommes servis de l'analogie réactionnelle entre l'iode et l'astate. Les différentes références iodées ainsi synthétisées nous ont permis dans un premier temps de caractériser le marquage à l'astate à l'aide de molécule iodée qu'il est possible de définir analytiquement et chimiquement. Dans un second temps, nous avons réalisé une étude d'optimisation multiparamétrique des

rendements de marquage de cette première étape réactionnelle entre le synthon et l'astate-211 obtenu par voie liquide.

III.3.2. Matériels et Méthodes

III.3.2.1. Matières premières

L'ensemble des réactifs chimiques utilisés sont des réactifs de la société Sigma-Aldrich (Steinheim - Allemagne). Le dioxane et l'acétonitrile sont des solvants fournis par la société Carlo-Erba (Val-de-Reuil - France).

L'iodure de sodium [^{125}I]NaI est un produit radiochimique Perkin-Elmer (Waltham, Massachusetts – Etats Unis). L'astate-211 est issu de la cible irradiée au cyclotron d'Orléans dont l'extraction a été précédemment décrite.

III.3.2.2. Synthèse du précurseur stannylé

La synthèse du précurseur stannylé se déroule en deux étapes (Figure n°48) [190].

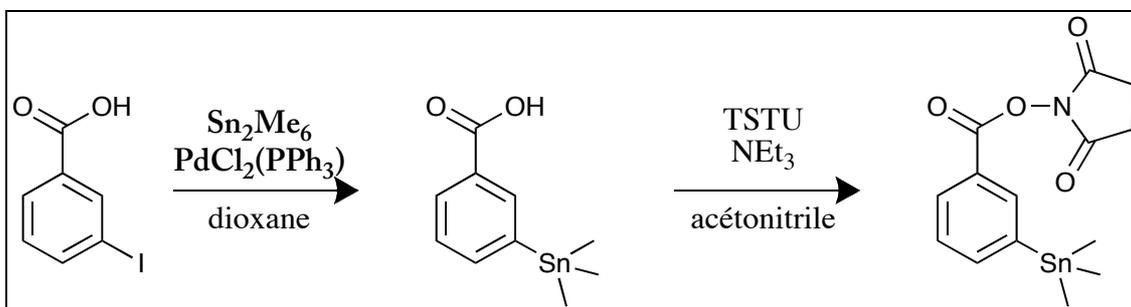


Figure n°48 : Réaction de préparation de l'ester 3-triméthylstannylbenzoate de N-hydroxysuccinimide. La première étape est une réaction de Stille entre l'acide 3-iodobenzoïque et l'hexaméthyldistannane (Sn_2Me_6) catalysée par le dichlorobis(triphénylphosphine) palladium (II) ($\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)$). Le composé obtenu est ensuite activé sous forme d'ester de N-hydroxysuccinimide (NHS). Cette activation est effectuée en présence de TSTU (tetrafluoroborate de O-(N-succinimidyl)-N,N,N',N'-tetraméthyluronium) et de triéthylamine (NEt_3).

La première étape de cette synthèse consiste à préparer l'acide 3-triméthylstannylbenzoïque. Pour cette réaction, 322 mg (1,27 mmol) d'acide 3-iodobenzoïque sont dissous dans 40 mL de dioxane anhydre sous azote. 1g (2,4 éq.) d'hexaméthylstannane puis 13,4 mg (0,015 éq.) de dichlorobis(triphénylphosphine) palladium (II) sont ajoutés et le milieu réactionnel est agité à 60°C pendant une nuit. Le solvant est évaporé puis le résidu repris dans du chloroforme et filtré sur célite. Le produit

obtenu est purifié sur gel de silice avec un éluant constitué d'un mélange chloroforme/acétate d'éthyle 7:3.

La seconde étape de cette synthèse consiste à estérifier l'acide précédemment obtenu. 103 mg de l'acide 3-triméthylstannylbenzoïque sont dissout dans 5 mL d'acétonitrile anhydre sous azote. 79 μL (1,5 eq.) de triéthylamine puis 227 mg (2 eq.) de TSTU sont ajoutés. On observe au bout de 5 minutes une coloration brune sombre du milieu réactionnel. Celui-ci est agité 30 minutes à température ambiante puis le solvant est évaporé, le résidu est repris dans du chloroforme et lavé à 2 reprises par une solution de chlorure de sodium saturée. La phase organique est séchée sur Na_2SO_4 , filtrée et évaporée. Le produit obtenu est purifié sur gel de silice avec un éluant constitué de dichlorométhane.

Les produits issus des 2 étapes de synthèse (acide 3-triméthylstannylbenzoïque et ester 3-(triméthylstannyl)benzoate de N-hydroxysuccinimidyle) ainsi obtenus sont analysés par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) sur un spectromètre Bruker AC (Rheinstetten - Allemagne) opérant à 250 MHz pour les spectres ^1H et à 400 MHz pour les spectres ^{13}C . Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm). Dans la description des spectres, les multiplicités des signaux sont indiquées à l'aide des abréviations s, d, t, q et m signifiant respectivement singulet, doublet, triplet, quadruplet et multiplet. Les spectres de masse sont effectués sur un spectromètre de masse Bruker Esquire LC (Rheinstetten - Allemagne) avec ionisation ElectroSpray (SM-ES) et analyseur à trappe d'ions en mode positif ou négatif.

III.3.2.3. Synthèse des références iodées

Le choix de ces références iodées et le moyen de les préparer est basé sur une technique définie au niveau de la littérature [191].

La forme non estérifiée du précurseur stannique (acide 3-triméthylstannylbenzoïque) est obtenue lors de l'une des étapes de synthèse de la forme ester fonctionnalisée (3-(triméthylstannyl)benzoate de N-hydroxysuccinimidyle).

Les références radioactives (forme acide ou ester de l'iodobenzoate) marquées à l'iode-125 sont obtenues de la façon suivante : à 5 μL de solution de NaCl saturée sont ajoutés 5 μmol de N-chlorosuccinimide (60 μL en méthanol/acide acétique 95:5) et 1 μmol de précurseur stannique (forme ester ou acide ; 100 μL en méthanol/acide acétique 95:5). A cette solution est ajoutée 2 μL de $^{125}\text{I}]\text{NaI}$ (7,4 MBq). Le temps d'incubation du radiomarquage est de 30 minutes à température ambiante.

Les références ainsi synthétisées sont étudiées en chromatographie liquide en phase inverse par HPLC sur colonne C₁₈ μ bondapack (3.9 x 300 mm ; 5 μ m) de la société Waters (Milford, Massachusetts – Etats Unis) avec une phase mobile isocratique constituée d'un mélange eau acide trifluoroacétique 0,1%/acétonitrile 85:15 sous un débit de 1 mL/mn. L'appareillage d'HPLC (pompe, injecteur, analyse UV) est de marque Waters. L'analyse radioactive est réalisée sur un gamma scintillateur à cristal de NaI(Tl) Flow Scintillation Analyser 150 TR de la société Packard Bioscience (Meriden, Connecticut – Etats Unis).

Les mêmes références sont étudiées par CCM sur silice de type Silica gel 60 F₂₅₄ de la société Merck avec une phase mobile constituée d'un mélange chloroforme/acétate d'éthyle 8 :2 révélée et analysée sur écran de phosphorescence Phosphorimager Typhoon-GE Healthcare (Orsay – France).

III.3.2.4. Radiomarquage du synthon à l'astate

La technique de marquage par substitution électrophile aromatique d'un halogène étant une réaction bien connue, nous avons adapté la méthode d'iodation à l'astate. La preuve de faisabilité de marquage du précurseur stannique (ester 3-(triméthylstannyl)benzoate de N-hydroxysuccinimidyle et acide 3-triméthylstannylbenzoïque) à l'astate est réalisée par ajout de 100 μ L d'astate-211 (8 à 12 MBq) en phase di-isopropylether sur 1 μ mol de précurseur (60 μ L) et 5 μ mol de N-chlorosuccinimide (100 μ L). Après 30 minutes de réaction à température ambiante, la solution est étudiée en chromatographie HPLC et CCM dans les mêmes conditions que les références iodées précédemment citées.

Afin de déterminer les meilleurs paramètres en vue d'obtenir le meilleur rendement de marquage sur le précurseur stannique (ester 3-(triméthylstannyl)benzoate de N-hydroxysuccinimidyle) à l'astate, on étudie l'impact de la quantité de chacun des réactifs ainsi que ceux du temps et du volume réactionnel. Les rendements réactionnels sont mesurés par CCM sur silice avec un éluant constitué d'un mélange chloroforme/acétate d'éthyle 8:2 révélé sur phosphorimager.

Le premier paramètre étudié concerne la quantité de précurseur mis en réaction. Dans un eppendorff, sont introduits 10 μ L de N-chlorosuccinimide (100 nmol), 100 μ L d'astate-211 en phase di-isopropylether et 10,9 μ L de précurseur stannique à concentration variable (4, 6, 10 et 20 nmol). Les rendements réactionnels sont mesurés après 15 minutes de réaction à température ambiante.

Dans le but d'étudier l'impact de la quantité en agent oxydant et du temps réactionnel, on introduit dans un eppendorff 100 μL d'astate en phase di-isopropylether, auxquels on ajoute 10,9 μL de précurseur stannique (20 nmol) et 10 μL de N-chlorosuccinimide à concentration variable en méthanol/acide acétique 95:5 (solution à 0 ; 2 ; 20 ; 100 ; 200 ou 1000 nmol). Les rendements réactionnels sont mesurés après 5, 10, 15, 30 et 60 minutes de réaction à température ambiante.

Dans l'objectif de déterminer l'impact du volume réactionnel, 3 essais de marquage à température ambiante et pendant 15 minutes sont effectués selon les modalités décrites dans le tableau n°20 :

Tableau n°20 : Paramètres de l'étude d'impact du volume réactionnel

Réaction	Précurseur stannique	NCS	^{211}At en DIPE	DIPE/ HNO_3	Volume final
C ₁	10,9 μL (20 nmol)	10 μL (100 nmol)	50 μL	/	70,9 μL
C ₂	10,9 μL (20 nmol)	10 μL (100 nmol)	50 μL	50 μL	120,9 μL
C ₃	10,9 μL (20 nmol)	10 μL (100 nmol)	100 μL	300 μL	420,9 μL

L'astate-211 étant extrait de la cible par attaque acide, on retrouve une forte concentration d'acide nitrique dans la phase di-isopropylether. Dans le but d'étudier l'impact de cet apport d'acide nitrique sur le marquage du précurseur stannique, des essais de contre extraction ont été réalisés :

- 500 μL de phase astate/di-isopropylether sont mis en contact avec 500 μL de soude 3 M. 100 μL de la phase astate/di-isopropylether ainsi contactés sont mis à réagir à température ambiante pendant 15 minutes avec 10 μL de N-chlorosuccinimide (100 nmol) et 10,9 μL de précurseur stannique (20 nmol),

- 100 μL de phase astate/di-isopropylether sont mis à réagir avec 10 μL de N-chlorosuccinimide (100 nmol) et 10,9 μL de précurseur stannique (20 nmol) à température ambiante pendant 15 minutes. Le milieu réactionnel est ensuite contre-extrait par contact avec 100 μL de soude 3 M.

Enfin, dans la mesure où la forme radiochimique de l'astate semble varier au niveau de ses différents degrés d'oxydation suite à un phénomène de radiolyse au sein de la solution de di-isopropylether/ HNO_3 , nous avons effectué un marquage de façon extemporanée à l'extraction et un autre 12 heures plus tard dans lequel l'astate a été soit

laissé seul dans la phase di-isopropylether soit « conservé » par un ajout de 500 nmol de N-chlorosuccinimide (50 μ L).

III.3.3. Résultats et discussion

III.3.3.1. Synthèse du précurseur stannique

La première étape de la synthèse conduit à la formation de 318 mg d'un solide blanc (rendement : 88 %) de formule brute $C_{10}H_{14}O_2Sn$ de masse molaire 284,9 g/mol (Figure n°49).

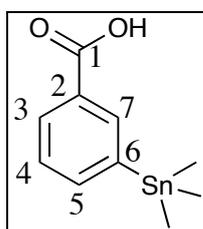


Figure n°49 : Acide 3-trimethylstannylbenzoïque.

Les analyses RMN 1H et ^{13}C du produit donnent les résultats suivants :

- RMN 1H : 0,35 (s,9H) ; 7,46 (m,1H) ; 7,75 (m,1H) ; 8,06 (m,1H) ; 8,25 (s,1H),
- RMN ^{13}C : 2,4 (CH_3) ; 128,2 (C_4) ; 129,8 (C_3) ; 130,4 (C_2) ; 135,7 (C_7) ; 141,1 (C_5) ; 141,8 (C_6) ; 172,0 (C_1).

Les analyses SM-ES donnent les résultats suivants :

- SM-ES+ : $[M+Na]^+$ = 308,9 ; SM-ES- : $[M-H]^-$ = 284,8

La seconde étape de la synthèse conduit à 129 mg d'une huile incolore (rendement : 92 %) de formule brute $C_{14}H_{17}NO_4Sn$ de masse molaire 382 g/mol (Figure n°50).

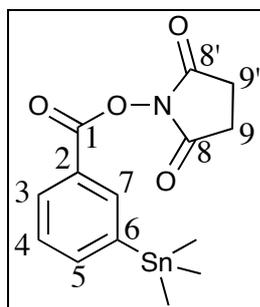


Figure n°50 : Ester 3-trimethylstannylbenzoate de N-hydroxysuccinimidyle.

Les analyses RMN 1H et ^{13}C du produit donnent les résultats suivants :

- RMN 1H : 0,34 (s,9H) ; 2,92 (s,4H) ; 7,47 (m,1H) ; 7,79 (m,1H) ; 8,06 (m,1H) ; 8,24 (m,1H),

- RMN ^{13}C : 2,4 (CH_3) ; 22,7 ($\text{C}_{9,9}$) ; 128,2 (C_4) ; 129,8 (C_3) ; 130,4 (C_2) ; 135,7 (C_7) ; 141,1 (C_5) ; 141,8 (C_6) ; 168,5 ($\text{C}_{8,8}$) ; 172,0 (C_1).

Les analyses SM-ES donnent les résultats suivants :

- SM-ES+ : $[\text{M}+\text{Na}+\text{MeOH}]^+ = 438,1$

La synthèse d'un groupement prosthétique bifonctionnel de type *Activated Tin Ester* permettant l'halogénéation d'une protéine est une synthèse en 2 étapes bien décrite qui donne un produit pur avec de très bons rendements (rendement global = 81 %).

III.3.3.2. Synthèse des références iodées

Le marquage à l'iode-125 de l'acide 3-triméthylstannylbenzoïque conduit à un produit présentant un temps de rétention en HPLC de 9,1 minutes (détection scintigraphique) analogue à celui de l'acide 3-iodobenzoïque commercial qui est de 8,6 minutes (détection UV). La différence entre ces 2 temps de rétention (0,5 minutes) correspond au volume mort (500 μL) de tubulure séparant l'analyseur UV situé en amont de l'analyseur radioactif (Figure n°51). L'ester 3- ^{125}I iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle obtenu présente dans les mêmes conditions HPLC un temps de rétention de 14,7 minutes. Il est à noter l'apparition d'un pic sur le radiochromatogramme correspondant au temps de rétention de l'acide 3-iodobenzoïque (9,1 minutes) formé par hydrolyse de l'ester. L'apparition de cet hydrolysate est également visible au niveau de CCM (Figure n°51). Dans ces conditions chromatographiques, l'acide 3- ^{125}I iodobenzoïque présente un R_f de 0,45 et l'ester 3- ^{125}I iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle présente un R_f de 0,67.

Les rendements obtenus lors de la synthèse des références iodées sont de 96 % dans le cas de l'acide 3- ^{125}I iodobenzoïque et de 89 % pour l'ester 3- ^{125}I iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle (avec la formation de 8 % 3- ^{125}I iodobenzoïque).

Dans la mesure où il ne peut exister d'analogue non radioactif à l'astate, nous avons synthétisé des références radiomarquées à l'iode de la forme ester activé et acide qu'il est possible d'identifier chimiquement. Les réactions d'halogéno-déstannylation ont démontré, dans les conditions expérimentales, de très bons rendements d'environ 90 %. Nos 2 références sont de plus facilement identifiables par technique chromatographique (HPLC et CCM) où la forme acide radiomarquée à l'iode-125 démontre une équivalence avec l'acide 3-iodobenzoïque non radioactif commercial.

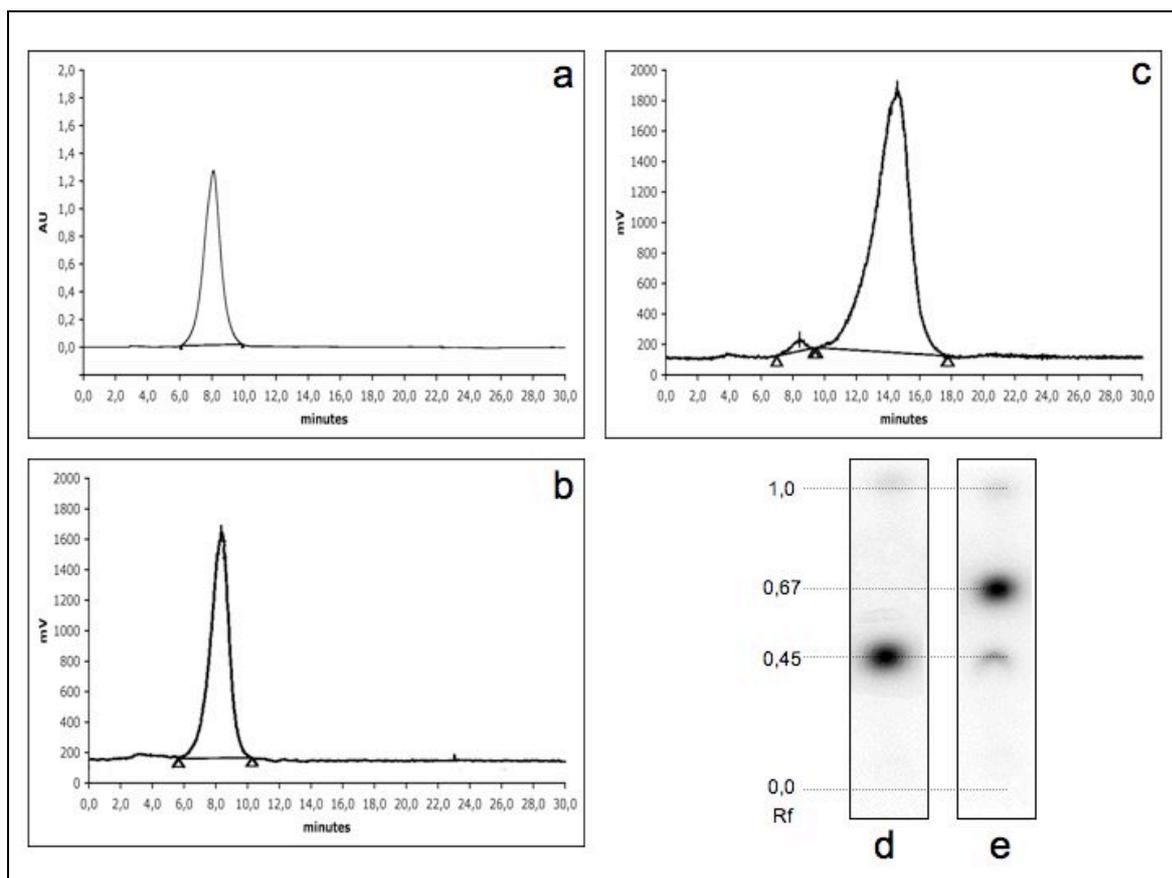


Figure n°51 : Analyse chromatographique des références acide 3- ^{125}I iodobenzoïque et ester 3- ^{125}I iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle. a. Radiochromatogramme UV obtenu par HPLC de l'acide 3- ^{125}I iodobenzoïque commercial ($t_r = 8,6$ minutes) ; b. Radiochromatogramme scintigraphique obtenu par HPLC de l'acide 3- ^{125}I iodobenzoïque ($t_r = 9,1$ minutes) ; c. Radiochromatogramme scintigraphique obtenu par HPLC de l'ester 3- ^{125}I iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle ($t_r = 14,7$ minutes), on observe la présence de la forme acide 3- ^{125}I iodobenzoïque formé par hydrolyse de l'ester ($t_r = 9,1$ minutes) ; d. Radiochromatographe de l'acide 3- ^{125}I iodobenzoïque obtenu par CCM ($R_f = 0,45$) ; e. Radiochromatographe de l'ester 3- ^{125}I iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle obtenu par CCM ($R_f = 0,67$), on observe la présence d'acide 3- ^{125}I iodobenzoïque ($R_f = 0,45$) formé par hydrolyse de l'ester.

III.3.3.3. Radiomarquage du synthon à l'astate

Le marquage à l'astate-211 de l'acide 3-triméthylstannybenzoïque conduit à un produit présentant un temps de rétention en HPLC de 9,2 minutes (détection scintigraphique). L'ester 3- ^{211}At astatobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle obtenu présente dans les mêmes conditions HPLC un temps de rétention de 14,9 minutes (Figure n°52). Il est à noter l'apparition d'un pic sur le radiochromatogramme correspondant au temps de rétention de l'acide 3- ^{211}At astatobenzoïque (9,2 minutes) formé par hydrolyse de l'ester. L'apparition de cet hydrolysat est également visible au niveau de la CCM (Figure n°52).

Dans ces conditions chromatographiques, l'acide 3-[²¹¹At]astatobenzoïque présente un Rf de 0,45 et l'ester 3-[²¹¹At]astatobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle présente un Rf de 0,67. Les rendements obtenus lors de la synthèse du groupement prosthétique marqué à l'astate-211 sont de 92 % dans le cas de l'acide 3-[²¹¹At]astatobenzoïque et de 84 % pour l'ester 3-[²¹¹At]astatobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle (avec la formation de 7 % d'acide 3-[²¹¹At]astatobenzoïque).

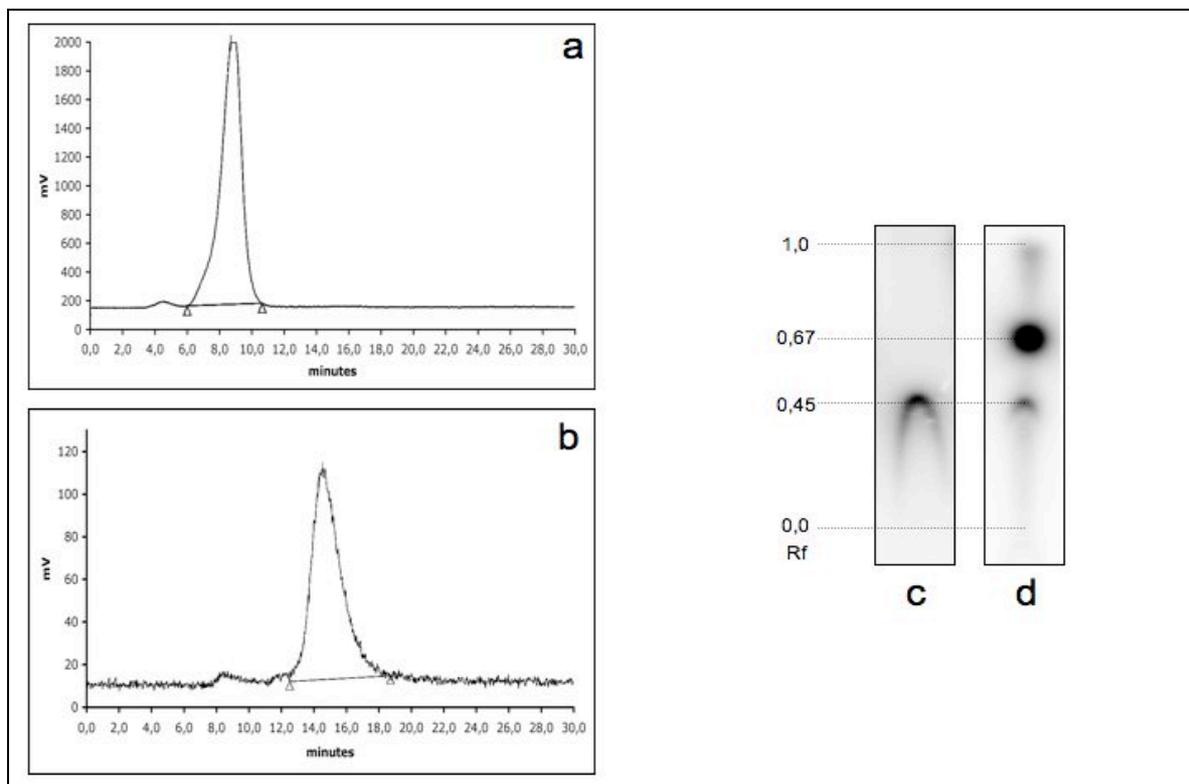


Figure n°52 : Analyse chromatographique de l'acide 3-[²¹¹At]astatobenzoïque et de l'ester 3-[²¹¹At]astatobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle. a. Radiochromatogramme scintigraphique obtenu par HPLC de l'acide 3-[²¹¹At]astatobenzoïque ($t_r = 9,2$ minutes) ; b. Radiochromatogramme scintigraphique obtenu par HPLC de l'ester 3-[²¹¹At]astatobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle ($t_r = 14,9$ minutes), on observe la présence de la forme acide 3-[²¹¹At]astatobenzoïque formé par hydrolyse de l'ester ($t_r = 9,2$ minutes) ; c. Radiochromatographe de l'acide 3-[²¹¹At]astatobenzoïque obtenu par CCM ($R_f = 0,45$) ; d. Radiochromatographe de l'ester 3-[²¹¹At]astatobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle obtenu par CCM ($R_f = 0,67$), on observe la présence d'acide 3-[²¹¹At]astatobenzoïque ($R_f = 0,45$) formé par hydrolyse de l'ester.

Les résultats des études paramétriques faisant varier la quantité de précurseurs stanniques, de N-chlorosuccinimide (NCS), du temps et du volume final sont donnés dans le tableau n°21.

Tableau n°21 : Résultats des études paramétriques de marquage du groupement prosthétique à l'astate-211.

Paramètre variable	Concentration Précurseur (mol/L)	Concentration NCS (mol/L)	Temps (minutes)	Volume ²¹¹ At/DIPE	Volume final	Rendement
Précurseur	3,31.10 ⁻⁵	8,27.10 ⁻⁴	15	100 µL	120,9 µL	20 %
	4,96.10 ⁻⁵					45 %
	8,27.10 ⁻⁵					71 %
	1,65.10 ⁻⁴					91 %
NCS	1,65.10 ⁻⁴	0	15	100 µL	120,9 µL	28 %
		1,65.10 ⁻⁵				53 %
		1,65.10 ⁻⁴				75 %
		8,27.10 ⁻⁴				86 %
		1,65.10 ⁻³				82 %
		8,27.10 ⁻³				83 %
Temps	1,65.10 ⁻⁴	8,27.10 ⁻⁴	5	100 µL	120,9 µL	73 %
			10			79 %
			15			86 %
			30			78 %
			60			82 %
Volume	1,65.10 ⁻⁴	8,27.10 ⁻⁴	15	50 µL	70,9 µL	91 %
				50 µL	120,9 µL	83 %
				100 µL	420,9 µL	51 %

Les études de contre-extraction de l'acide nitrique depuis la phase di-isopropylether par ajout à volume égal de soude 3 M ont donné des résultats variables suivant le temps de réaction. En effet, en 15 minutes, les rendements de marquage obtenus sont de l'ordre de 44 % (contre 83 % lorsque la phase organique n'est pas contre-extraite) et de 70 % après 16 heures d'incubation à température ambiante.

La contre-extraction réalisée après le marquage de l'ester 3-[²¹¹At]astatobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle s'est soldée par un échec prévisible dans la mesure où le pH alcalin de la soude 3M conduit à l'hydrolyse de l'ester. En effet, les rendements de marquage avant contre-extraction sont de 86 % et que seuls 35 % de l'ester subsiste après contre extraction (apparition de 40 % de forme acide hydrolysée).

Les études de stabilisation du degré d'oxydation de l'astate par ajout de N-chlorosuccinimide n'ont pas permis, dans le cas de l'extraction liquide de démontrer une réelle différence de réactivité après 12 heures de conservation. En effet, dans les 2 cas (avec et sans N-chlorosuccinimide), les rendements de marquage furent médiocres avec

seulement 25 % de 3-^[211At]astatobenzoate de N-hydroxysuccinimide formé. L'astate évolue dans des conditions oxydantes (acide nitrique avec ou sans N-chlorosuccinimide) vers une forme migrant avec un R_f = 1 dans le système chromatographique utilisé dont la phase mobile est apolaire. Les degrés d'oxydations potentiels à ce pH peuvent être la forme d'intérêt +I (forme réagissant lors de la substitution électrophile) ou sous formes d'espèces +III ou +V considérées comme des impuretés [104, 189]. Le facteur cinétique présente par conséquent un rôle important dans l'évolution de la spéciation de l'astate et il semble nécessaire d'effectuer la réaction de marquage très peu de temps après l'extraction afin d'obtenir les meilleurs rendements de marquage.

Le marquage de nos précurseurs stannylés (acide et ester) à l'astate conduit à la synthèse de 2 molécules présentant les mêmes caractéristiques chromatographiques que les références iodées. Nous pouvons donc conclure en la faisabilité de la préparation d'un ester activé marqué à l'astate avec des rendements de 85%.

En vue d'optimiser l'étape de marquage du groupement prosthétique à l'astate-211, nous avons étudié l'implication des divers paramètres réactionnels. Cette étude a permis de démontrer que les rendements sont d'autant plus élevés que la quantité de précurseur initiale est importante, que la quantité optimale d'oxydant (N-chlorosuccinimide) est de 5 équivalent par rapport au précurseur et que cette réaction se déroule d'autant mieux dans un petit volume avec un temps optimal de réaction de 15 minutes.

Les études de contre-extraction de l'acide nitrique depuis la phase di-isopropylether montrent que la présence d'acide nitrique dans la phase organique est indispensable à une bonne cinétique de marquage. Il semble que l'acide nitrique ait un effet stabilisant de l'astate sous un degré d'oxydo-réduction favorable à la substitution électrophile d'astato-destannylation.

De plus, le pH acide de la solution permet d'éviter l'hydrolyse de l'ester conduisant à une forme acide non fonctionnelle pour la seconde étape de couplage à une structure protéique.

III.4. Couplage à une structure protéique

III.4.1. Introduction

Une fois la première étape de marquage du groupement prosthétique réalisée, il convient de définir et d'optimiser les paramètres de marquage permettant de lier ce synthon à la structure protéique d'un anticorps. Dans la mesure où notre molécule organique marquée à l'astate-211 présente une fonction ester de N-hydroxysuccinimide, le couplage à l'anticorps se réalisera sur le résidu amine d'une lysine stériquement accessible. Parmi les différents paramètres qu'il est possible de moduler, nous étudierons au cours de cette partie l'influence du pH réactionnel, de la concentration en anticorps, de la température et du temps de réaction.

Afin d'optimiser ces différents paramètres, des études d'optimisation ont été effectuées avec la référence iodé ester de 3-[¹²⁵I]iodobenzoate de N-hydroxysuccinimide. Une étude préliminaire sur la réaction d'hydrolyse de l'ester a été menée afin de déterminer les conditions de cette réaction qui est compétitive à la réaction de couplage protéique (Figure n°53). Une fois l'ensemble des conditions optimales définies, un couplage de l'ester 3-[²¹¹At]astatobenzoate de N-hydroxysuccinimide à un anticorps monoclonal de type immunoglobuline entière et fragment F(ab')₂ a été réalisé.

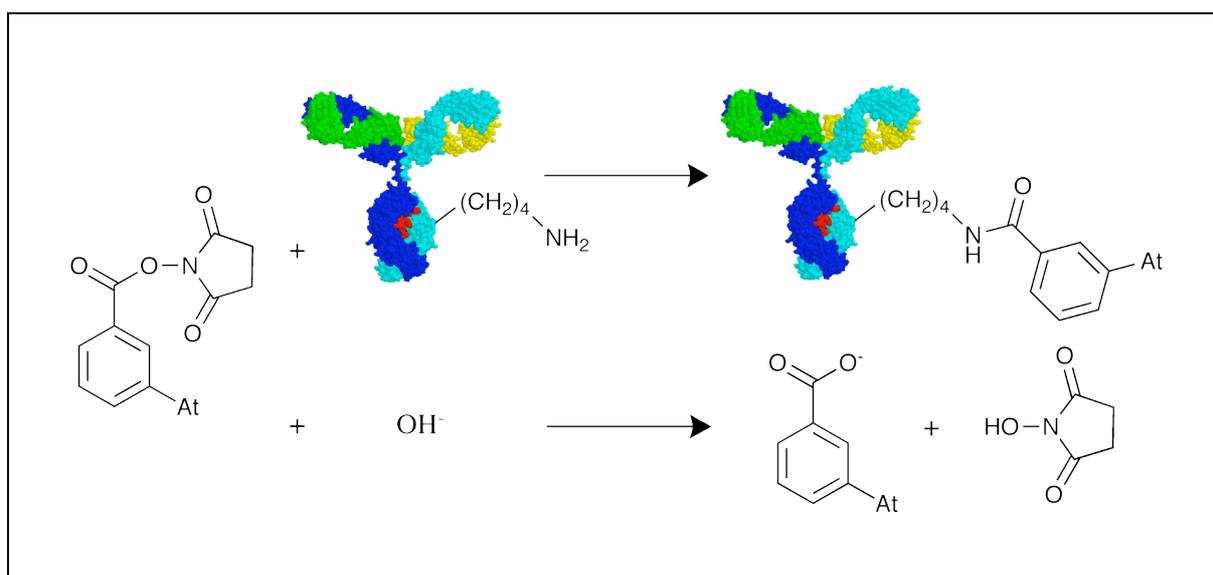


Figure n°53 : Compétition entre le marquage de l'anticorps et la réaction d'hydrolyse de l'ester.

III.4.2. Matériels et méthodes

III.4.2.1. Matières premières

L'ester 3-[¹²⁵I]iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle et l'ester 3-[²¹¹At]astatobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle sont synthétisés suivant les procédures optimisées décrites précédemment. Les tampons réactionnels sont préparés à partir de produits fournis par la société Sigma-Aldrich (Steinheim - Allemagne). L'immunoglobuline entière servant au couplage est un anticorps de type IgG2b de rat dirigé contre le CD105 (endoglin). Cet anticorps (MJ7/18) est obtenu à partir d'un hybridome mis à disposition par l'université de médecine de Stanford (Stanford, Californie – Etats-Unis). L'anticorps est extrait et purifié *in situ* au sein du laboratoire INSERM U 892.

III.4.2.2. Préparation des solutions tampons

Afin de couvrir la gamme de pH allant de 5 à 6,5, une solution-mère de citrate à 0,5 mol/L est préparée en dissolvant 10,507 g d'acide citrique ($5 \cdot 10^{-2}$ mol) dans 100 mL d'eau. Les pH sont ajustés à 5,0 ; 5,5 ; 6,0 et 6,5 au pHmètre par ajout de citrate de sodium à 0,5 mol/L.

Les pH 7,0 et 7,5 sont obtenus à partir d'un tampon phosphate à 0,5 mol/L préparé en dissolvant 1,025 g d'acide phosphorique (NaH_2PO_4 : $1,25 \cdot 10^{-2}$ mol) dans 25 mL d'eau. Les pH sont ajustés à 7,0 et 7,5 au pHmètre par ajout d'hydrogénophosphate disodique (Na_2HPO_4) à 0,5 mol/L.

Les pH allant de 8,0 à 9,0 sont obtenus à partir d'un tampon borate à 0,5 mol/L préparé en dissolvant 773 mg d'acide borique ($1,25 \cdot 10^{-2}$ mol) dans 25 mL d'eau. Les pH sont ajustés à 8,0 ; 8,5 et 9,0 au pHmètre par ajout de borate de sodium à 0,5 mol/L.

Dans le but d'effectuer le couplage avec l'astate, une solution tampon de carbonate 300 mM à pH 8,6 est préparée comme suit : 24,741 g (0,295 mol) d'hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO_3) sont mélangés avec 0,690 g (0,005 mol) de bicarbonate de sodium (Na_2CO_3).

La purification de l'anticorps après marquage est effectuée à l'aide d'un tampon phosphate 0,1 M à pH = 7,2 préparé en mélangeant 7,9236 g (0,056 mol) de dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4) et 6,0853 g (0,044 mol) d'hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4) dans 1 L d'eau.

III.4.2.3. Étude de l'hydrolyse de l'ester 3-[¹²⁵I]iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle

L'acide 3-[¹²⁵I]iodobenzoïque et l'ester 3-[¹²⁵I]iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle sont préparés conformément à la synthèse décrite lors de la préparation des références iodées. Afin de réaliser l'étude de la cinétique d'hydrolyse de l'ester vers la forme acide, on prélève 5 µL de la solution d'ester 3-[¹²⁵I]iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle auxquels on ajoute 100 µL de tampon à différents pH compris entre 5,0 et 9,0. L'hydrolyse est étudiée par CCM à différents temps réactionnels sur silice avec un éluant constitué d'un mélange chloroforme/acétate d'éthyle 8:2.

III.4.2.4. Conditionnement de l'anticorps

L'anticorps est conservé après purification de l'hybridome dans un tampon de type *Phosphate Buffer Saline 1X (PBS 1X)* de pH = 7,2. Afin de pouvoir mener à bien nos études, l'anticorps est reconditionné dans le tampon d'intérêt par passage sur colonne de chromatographie d'exclusion sur gel Sephadex[®] de type PD-10 fournis par la société Amersham-Bioscience GE Healthcare (Uppsala - Suède). La colonne est préalablement équilibrée par 10 mL de tampon d'intérêt puis, 200 µL de la solution-mère d'anticorps sont déposés en tête de colonne. Enfin, la colonne est éluee par fraction de 500 µL de tampon d'intérêt. Les fractions d'intérêt sont collectées et réunies. Le volume de solution d'anticorps est réduit par passage sur membrane Centricon[®] de la société Millipore (Billerica, Massachusetts – Etats-Unis) avec une coupure à 30 kDa. La concentration finale en anticorps est mesurée sur 2 µL de solution sur nanodrop[®] à 280 nm de la société Thermo Scientific (Wilmington, Delaware - Etats-Unis). Le pH final de la solution est contrôlé par pHmétrie.

III.4.2.5. Etude de l'influence des paramètres de couplage à l'immunoglobuline entière

Le rôle du pH sur la fixation de l'ester 3-[¹²⁵I]iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle à une structure protéique est déterminé par ajout de 50 µg (41 µL) d'anticorps (immunoglobuline entière) dans 100 µL de tampon de pH variant de 5,0 à 9,0 sur 5 µL de l'ester 3-[¹²⁵I]iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle préalablement évaporé à sec. Les réactions se déroulent à température ambiante pendant 30 minutes.

Le rôle de la concentration en anticorps est déterminé par ajout de 10 μL de l'ester 3- ^{125}I iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle sur un volume d'anticorps variant de 5 à 150 μL (0,033 à 1,5 nmol) dans un volume de tampon pH 8 adapté pour qsp 210 μL à température ambiante pendant 30 minutes.

Le rôle de la température est déterminé par ajout de 5 μL de l'ester 3- ^{125}I iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle sur 50 μg d'anticorps (41 μL) dans 100 μL de tampon de pH 8 à 25, 30, 35 et 40°C pendant 30 minutes.

Le rôle de la cinétique réactionnelle est déterminé par prélèvements à différents temps (5, 10, 15, 20, 25 et 30 minutes) de la réaction de couplage se déroulant comme suit : 5 μL de l'ester 3- ^{125}I iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle sont ajoutés sur 50 μg d'anticorps (41 μL) dans 100 μL de tampon de pH 8 à température ambiante.

Les rendements de couplage de l'ester 3- ^{125}I iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle à l'anticorps sont déterminés par CCM sur ITLC-SG élué par de l'acide trichloracétique 10% révélé au Phosphorimager (Typhoon-GE Healthcare).

III.4.2.6. Marquage d'un anticorps à l'astate

Après extraction de la cible d'astate-211 et afin d'éliminer l'acide nitrique, le diisopropylether est évaporé pendant 20 minutes par chauffage au bloc chauffant à 40°C sous flux d'azote. Le résidu sec est repris par 200 μL d'un mélange méthanol/acide acétique 95 :5 et mis à compter dans une chambre d'ionisation non calibrée pour l'astate-211 de type ACAD 2000 de la société Lemer Pax (Carquefou – France). Cette solution est déposée sur une colonne SepPak C_{18} fournie par la société Waters (Milford, Massachusetts – Etats-Unis) préalablement reconditionnée par passage de 5 mL d'un mélange eau/acide trifluoroacétique 0,1%, 5 mL d'acétonitrile et enfin 5 mL d'un mélange eau/acide trifluoroacétique 0,1%.

Après dépôt des 200 μL , la colonne SepPak C_{18} est éluée par 2 mL d'un mélange eau/acide trifluoroacétique 0,1% puis par 2 mL d'acétonitrile. Les fractions aqueuses et organiques sont comptées dans une chambre d'ionisation puis la phase organique est mise à évaporer pendant 35 minutes par chauffage au bloc chauffant à 40°C sous flux d'azote.

300 μL d'immunoglobulines entières reconditionnées en tampon carbonate 300 mM pH = 8,5 sont déposées sur le résidu sec préalablement obtenu. La réaction se déroule à 37°C pendant 15 minutes. Le rendement de couplage est déterminé par CCM sur ITLC-SG élué par de l'acide trichloracétique 10%. Après migration, la CCM est coupée au centre et chaque partie est comptée au gamma spectromètre NaI(Tl) de la société Raytest (Straubenhardt - Allemagne). L'anticorps radiomarqué est ensuite purifié par passage sur colonne de chromatographie d'exclusion sur gel Sephadex[®] de type NAP-5 de la société

Amersham-Bioscience GE Healthcare (Uppsala - Suède). La colonne est préalablement reconditionnée par 5 mL de tampon phosphate 0,1 M (pH = 7,2). L'ensemble du volume de la solution d'anticorps radiomarqué est déposé sur la colonne et cette dernière est éluée par fraction de 200 µL de tampon phosphate. Les fractions d'élutions sont collectées et comptées sur gamma spectromètre NaI(Tl) de la société Raytest (Straubenhardt, - Allemagne). Les fractions d'intérêt sont réunies dans un tube à hémolyse préalablement taré afin de permettre une détermination du volume collecté par pesée. La pureté radiochimique du produit ainsi purifié est mesurée par CCM sur ITLC-SG élué par de l'acide trichloracétique 10%. Après migration, la CCM est coupée au centre et chaque partie est comptée au gamma spectromètre NaI(Tl).

Afin de confirmer la pureté radiochimique, une fraction aliquotée de l'immunoglobuline entière marquée est injectée sur un appareillage chromatographique de gel exclusion sur colonne de type Superdex G200 10/300 GL (GE Healthcare Bio-Science, Uppsala – Suède) éluée par une phase isocratique constituée d'un tampon phosphate 0,1 M pH = 7,2 à un débit de 1 mL/min.

III.4.3. Résultats et discussions

III.4.3.1. Étude de l'hydrolyse de l'ester l'ester 3-[¹²⁵I]iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle

Les résultats de l'étude de l'hydrolyse de l'ester 3-[¹²⁵I]iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle sont donnés dans le tableau n°22.

Les résultats de cette étude montrent une absence complète d'hydrolyse pour les pH acides 5,0 et 6,0 (80 - 85 % de l'iode-125 au Rf de l'ester pendant 45 minutes d'incubation). A pH = 7,0, on observe une hydrolyse de 50 % de l'ester en 30 minutes. A pH = 8,0, on observe 70 % d'hydrolysat en 10 minutes et à pH = 9,0, l'hydrolyse est complète en 10 minutes.

Lors de la réaction de couplage entre le groupement prosthétique radiomarqué et la structure protéique, on observe une compétition entre le couplage proprement dit et une réaction d'hydrolyse engendrant la formation d'un acide radiomarqué non couplable à la structure protéique. L'étude de cette réaction d'hydrolyse montre qu'elle est d'autant moins importante que le pH réactionnel est acide (pH < 7,0).

Tableau n°22 : Résultats de l'étude d'hydrolyse de l'ester.

pH	Temps	% ester	% acide
5,0	0 minutes	85 %	7 %
	10 minutes	83 %	8 %
	20 minutes	84 %	8 %
	30 minutes	86 %	7 %
	45 minutes	82 %	8 %
6,0	0 minutes	83 %	9 %
	10 minutes	84 %	7 %
	20 minutes	79 %	11 %
	30 minutes	81 %	9 %
	45 minutes	76 %	15 %
7,0	0 minutes	81 %	7 %
	10 minutes	75 %	12 %
	20 minutes	66 %	23 %
	30 minutes	51 %	48 %
	45 minutes	32 %	60 %
8,0	0 minutes	84 %	5 %
	10 minutes	23 %	68 %
	20 minutes	15 %	71 %
	30 minutes	11 %	80 %
	45 minutes	13 %	80 %
9,0	0 minutes	83 %	8 %
	10 minutes	5 %	81 %
	20 minutes	0 %	86 %
	30 minutes	1 %	89 %
	45 minutes	0 %	87 %

III.4.3.2. Conditionnement de l'anticorps

L'anticorps purifié par gel-filtration (Figure n°54) à l'aide d'une colonne Sephadex® G25 (PD10) apparaît dans les tubes n°4,5,6.

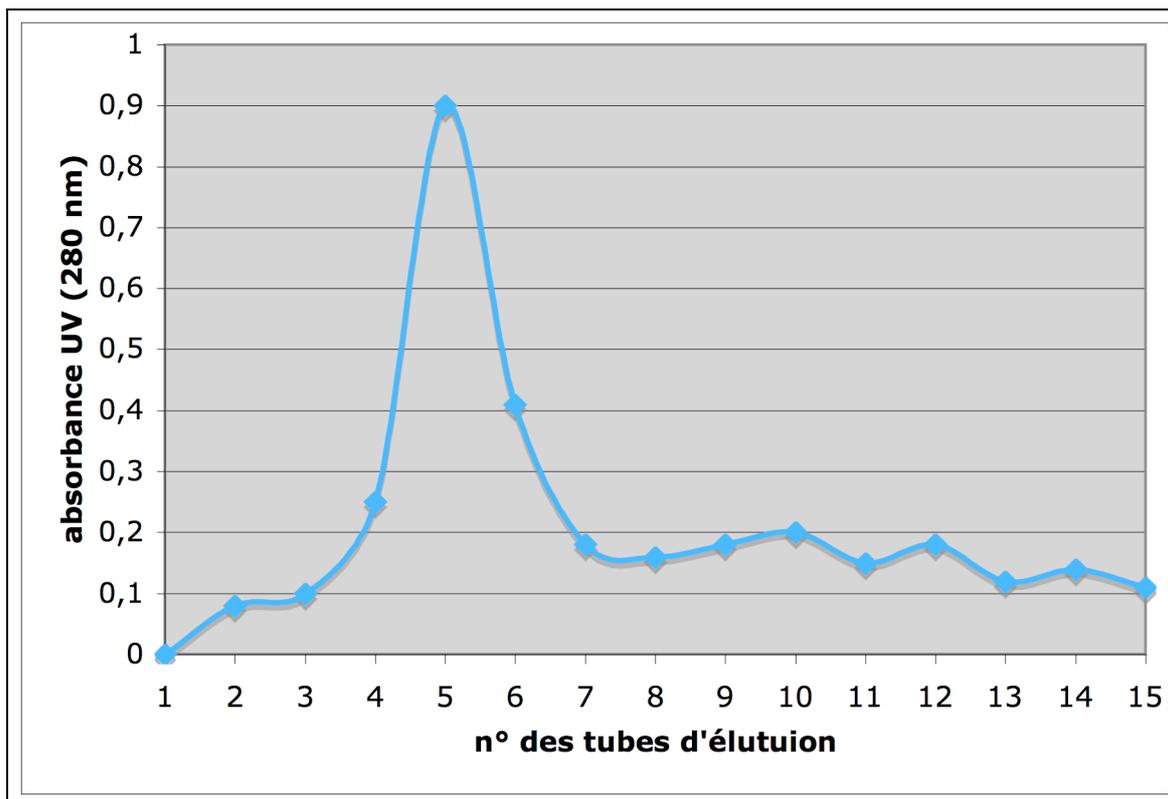


Figure n°54 : Exemple de profil d'élution sur gel exclusion d'une immunoglobuline entière.

Les tubes poolés présentent, après concentration au centricon®, une concentration mesurée au nanodrop® qui est dépendante de la concentration initiale déposée et sera précisée en fonction des expériences réalisées.

III.4.3.3. Etude de l'influence des paramètres de couplage à l'anticorps

L'anticorps reconditionné dans les différents tampons pour l'étude de l'influence du paramètre pH présente une concentration de 1,2 mg/mL. Les résultats des rendements de marquage à l'anticorps en fonction des différents paramètres sont donnés dans le tableau n°23 :

Tableau n°23 : Résultats de l'étude multiparamétrique de couplage entre l'ester 3-¹²⁵I]iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle et une immunoglobuline.

Paramètre	Volume de SIB	Quantité d'anticorps	Volume de tampon	pH du tampon	Température	Temps	Rendement
pH	5 µL	50 µg	100 µL	5,0	TA	30	4,9 %
				5,5			4,7 %
				6,0			6,1 %
				6,5			7,4 %
				7,0			8,4 %
				7,5			17,0 %
				8,0			25,7 %
				8,5			24,3 %
Concentration anticorps	10 µL	5 µL (7,5 µg)	195 µL	8,0	TA	30	17,1 %
		15 µL (22,5 µg)	185 µL				28,2 %
		50 µL (75 µg)	150 µL				30,4 %
		150 µL (225 µg)	50 µL				41,4 %
Température	5 µL	41 µL	100 µL	8,0	25 °C	30	21,2 %
					30 °C		23,9 %
					35 °C		28,1 %
					40 °C		31,3 %
Temps	5 µL	41 µL	100 µL	8,0	TA	5	17,9 %
						10	20,5 %
						15	22,6 %
						20	21,3 %
						25	21,9 %
						30	23,2 %

Afin d'étudier le pH optimal de couplage entre l'ester 3-¹²⁵I]iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle à l'immunoglobuline, nous avons mené une étude paramétrique de la réaction à différents pH. Pour cela, nous avons reconditionné l'anticorps dans des solutions tampons à pH différents par une technique classique de changement de tampon sur colonne de gel-exclusion suivie d'une concentration sur centricon[®] afin d'obtenir une concentration de 1,2 mg/mL. Cette étude du paramètre pH montre que la réaction de couplage ne peut se dérouler qu'à partir d'un pH alcalin > 7,5 et qu'elle semble atteindre un plateau dans les conditions expérimentales aux alentours de pH = 8,0 – 8,5. Ce phénomène est explicable par le fait que la fixation de l'ester sur la partie NH₂ terminale de la protéine (situé à proximité des paratopes de l'anticorps) est optimale à pH = 7,0 et que la fixation sur le NH₂ situé en ε d'un résidu lysine (qui est la réaction voulue) se déroulera préférentiellement à un pH proche

de 8,5 [192]. Cette étude permet d'optimiser le couplage de l'ester à la structure protéique qui est cinétiquement favorable à l'hydrolyse à pH = 8,5 en conservant l'ester à pH acide pendant toutes les étapes de synthèses et de purification antérieures et en n'introduisant l'anticorps et la solution tampon de pH = 8,5 dans le milieu réactionnel qu'au moment du couplage.

L'étude du paramètre température montre que le rendement de couplage est d'autant plus important que la température est élevée. Dans la mesure où les immunoglobulines sont des protéines biologiques et qu'une trop grande température peut les dénaturer et leur faire perdre leurs activités biologiques, on travaillera à une température de 37°C.

Le temps de réaction est relativement rapide, en effet, le rendement de couplage atteint un plateau à partir de 10-15 minutes. Il est à remarquer qu'un temps supérieur s'avère inutile dans la mesure où à ce pH, l'hydrolyse devient très importante à partir de 15 minutes.

Enfin, l'étude paramétrique faisant varier la concentration en anticorps montre que le rendement de marquage est d'autant plus élevé que la quantité d'anticorps introduite est importante. Cet apport étant limité par la concentration limite à partir de laquelle l'anticorps peut précipiter (cette concentration limite étant variable d'un anticorps à l'autre).

Les résultats de cette étude montrent que la réaction de couplage se déroule de façon optimale à 37 °C en 15 minutes à pH = 8,5 et que les rendements de couplages sont d'autant plus importants que la concentration en anticorps est importante.

III.4.3.4. Marquage d'un anticorps à l'astate

Sur les 100% de l'activité mesurée au niveau des 200 µL de méthanol/acide acétique 95 :5, on retrouve après SepPak C₁₈ environ 90 % de l'activité dans la phase organique d'acétonitrile. L'étude de la CCM de cette solution montre la disparition de la forme acide hydrolysée de l'ester et de l'astate libre qui ont été élués par la phase aqueuse. Le rendement de marquage de l'immunoglobuline entière montre un rendement de 32,3 % (Figure n°55).



Figure n°55 : CCM sur ITLC-SG élué par de l'acide trichloracétique 10 % d'une IgG entière marquée à l'astate-211.

Les profils d'élutions sur gel-filtration (Figure n°56) à l'aide d'une colonne Sephadex[®] NAP-5 montrent que les fractions d'intérêts apparaissent dans les tubes n°3,4,5 et 6 pour l'immunoglobuline entière le fragment F(ab')₂.

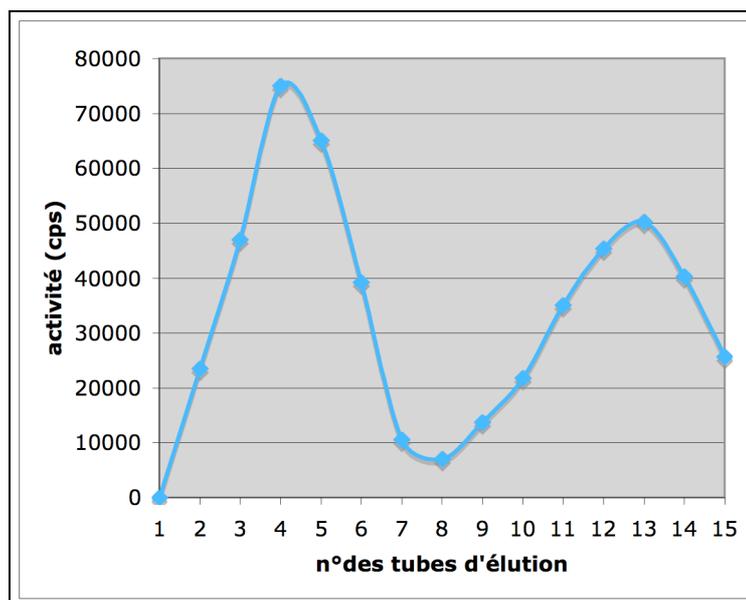


Figure n°56 : Profil d'élution de gel exclusion sur colonne NAP-5 d'une immunoglobuline marquée à l'astate-211.

La chromatographie HPLC montre un seul pic avec un temps de rétention de 17,03 minutes et la CCM donne un résultat pour la pureté radiochimique de 97,4 % (Figure n°57).

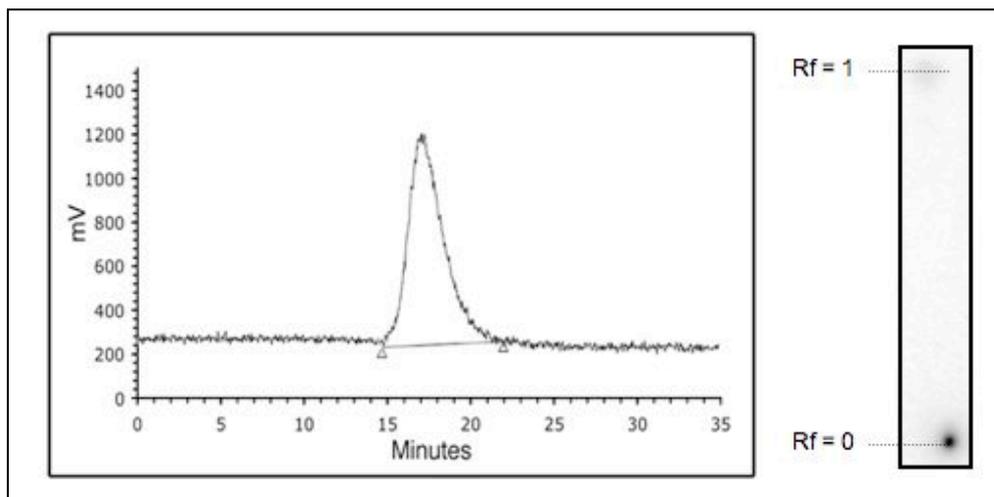


Figure n°57 : Pureté radiochimique de l'anticorps marqué à l'astate-211. A gauche : radio-chromatogramme HPLC montrant 1 pic de rétention à 17,03 minutes. A droite, CCM montrant une pureté radiochimique de 97,4 %.

Les résultats de différents essais de marquage sont donnés dans le tableau n°24.

Tableau n°24 : Résultats des marquage d'une IgG entière et d'un fragment $F(ab')_2$ à l'astate-211.

Concentration de l'anticorps utilisé	Voulme d'anticorps utilisé	Rdt de marquage	Volume final (post-NAP5)	Activité	PRC**	Activité spécifique (MBq/mg)
0,12 mg/mL	380 μ L	14,9 %	800 μ L	744 kBq	94,7 %	16,3
0,26 mg/mL	190 μ L	21,9 %	572 μ L	1,64 MBq	96,8 %	33,2
0,44 mg/mL	200 μ L	19,5 %	650 μ L	407 kBq	99,2 %	4,6
0,78 mg/mL	200 μ L	40,9 %	762 μ L	2,35 MBq	94,4 %	15,0
1,84 mg/mL	150 μ L	48,0 %	730 μ L	6,27 MBq	96,9 %	22,7
2,0 mg/mL	150 μ L	49,2 %	600 μ L	9,3 MBq	99,1 %	31,0
2,11 mg/mL	200 μ L	54,2 %	722 μ L	12,8 MBq	98,1 %	30,3
6,4 mg/mL	200 μ L	67,8 %	770 μ L	13,4 MBq	97,4 %	10,5

* Rdt = rendement ; **PRC = Pureté radiochimique

L'application de ces différents paramètres au couplage de l'ester 3- $[^{211}\text{At}]$ astatobenzoïque de N-hydroxysuccinimidyle sur un anticorps ont nécessité d'extraire la forte quantité d'acide nitrique qui est difficile à tamponner lors de l'ajout de l'anticorps. Les rendements de marquage sont dépendants de la quantité d'anticorps utilisée et, comme l'avait prédit l'étude paramétrique, ce rendement est d'autant plus élevé que la quantité est importante. Néanmoins, il faut remarquer que l'activité spécifique rencontre un plateau à environ 30 MBq/ mg d'anticorps. En effet, l'activité initiale d'astate-211 est limitée par la production du cyclotron d'Orléans et il n'est pas possible de séparer les immunoglobulines marquées à l'astate-211 de celles non-marquées. Il conviendra donc de trouver un compromis entre l'activité totale et l'activité spécifique de l'anticorps utilisé.

Enfin, la pureté radiochimique de l'anticorps marqué à l'astate-211 est satisfaisante (moyenne = 97,1 %) pour une utilisation clinique ultérieure. Le radiochromatogramme HPLC montre un pic à un temps de rétention de 17,03 minutes similaire à celui obtenu avec un anticorps marqué à l'iode-125. Le radiochromatogramme ne révélant qu'un unique pic démontre que les molécules d'anticorps n'ont pas été précipité ou aggloméré lors de l'étape de couplage

III.5. Stabilité *in vitro* du marquage

III.5.1. Introduction

L'efficacité thérapeutique de la radio-immunothérapie α est directement dépendante de la stabilité du marquage entre l'astate-211 et la structure protéique. En effet, le fait que l'astate-211 reste fixé à l'anticorps vecteur garanti une irradiation maximale de la tumeur et une irradiation minimale des tissus sains. La fixation de l'astate-211 à l'anticorps monoclonal se faisant par l'intermédiaire d'un groupement prosthétique, on pourra noter 2 cas de figure :

- la liaison carbone-astate se rompt et l'astate libre suit son métabolisme propre avec une fixation thyroïdienne, gastrique, splénique et pulmonaire ;
- la liaison amide entre l'acide 3-[²¹¹At]astatobenzoïque et la lysine protéique se rompt par hydrolyse avec la libération d'acide 3-[²¹¹At]astatobenzoïque qui après un métabolisme hépatique vraisemblablement similaire à celui de l'acide 3-[¹²⁵I]iodobenzoïque sera éliminé par voie urinaire.

Afin de déterminer la stabilité de notre radiomarquage à l'astate-211 nous avons mis en place un test *in vitro* où l'anticorps radiomarké est mis à incuber en présence de sérum humain. Cette incubation est réalisée à différentes températures afin de discriminer une instabilité chimique d'un métabolisme enzymatique. Dans la mesure où l'un des métabolites éventuels de l'immunoglobuline marquée est l'acide 3-[²¹¹At]astatobenzoïque nous avons étudié le comportement de cet acide vis à vis de la protéine majoritaire du sérum humain, l'albumine.

Pour ce faire, nous avons étudié le comportement de l'acide 3-[²¹¹At]astatobenzoïque en présence de protéine plasmatique (*Bovin Serum Albumin*) afin de déterminer son taux de fixation.

III.5.2. Matériels et méthodes

III.5.2.1. Matières premières

L'immunoglobuline entière (anticorps MJ7/18 anti-CD105) est radiomarkée conformément aux procédures décrites précédemment et présente une pureté radiochimique

de 99,1 %. Le sérum humain est obtenu à partir d'un pool de sang humain. La *Bovin Serum Albumin* (BSA) est un produit Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne).

III.5.2.2. Test de stabilité sérique

70 μL de solution d'anticorps (IgG entière) sont mis à incuber à 4°C, 20°C et 37°C dans 630 μL de sérum humain ou 630 μL de tampon phosphate. L'évolution de la stabilité est déterminée par évolution de la pureté radiochimique au cours du temps. Cette pureté radiochimique est calculée par CCM à différents temps sur ITLC-SG éluée par de l'acide trichloracétique 10% révélée au Phosphorimager Typhoon - GE Healthcare (Orsay - France).

III.5.2.3. Fixation protéique

100 μL de solution d'acide 3-[²¹¹At]astatobenzoïque (5,5 MBq) en phase diisopropylether / acide nitrique sont évaporés à sec et sont mis à incuber dans 500 μL de solution d'albumine bovine à 40 mg/mL en tampon phosphate 0,3 M pH = 7,2. La fixation protéique est mesurée à différents temps (6 et 12 heures) par chromatographie d'exclusion sur gel Sephadex[®] de type NAP-5. La colonne est préalablement équilibrée par 10 mL de tampon phosphate 0,3 M pH = 7,2, puis 200 μL de la solution contenant le mélange acide astato-benzoïque / BSA est déposée en tête de colonne. Enfin, la colonne est éluée par fraction de 500 μL de tampon phosphate 0,3 M pH = 7,2. Les fractions d'intérêt sont collectées et mesurées sur gamma spectromètre NaI(Tl) de la société Raytest (Straubenhardt - Allemagne). Les taux de fixation sont déterminés par la surface sous la courbe du pic d'éluion par rapport à la surface totale sous la courbe.

La non-covalence de la liaison acide astatobenzoïque / BSA est vérifiée par précipitation de la fraction protéique par ajout de 200 μL de méthanol sur les 100 μL restant du milieu d'incubation. Après centrifugation (5000 tours par minute, 5 minutes), le surnageant et le culot sont séparés. L'identification de l'acide astatobenzoïque dans le surnageant est démontrée par injection d'une fraction aliquotée du surnageant en HPLC sur colonne C₁₈ μ bondapack Waters (3.9 x 300 mm ; 5 μm) avec une phase mobile isocratique constituée d'un mélange eau acide trifluoroacétique 0,1% / acétonitrile 85:15 sous un débit de 1 mL/mn. L'appareillage d'HPLC (pompe, injecteur, analyse UV) de marque Waters. L'analyse radioactive est réalisée sur un gamma scintillateur à cristal de NaI(Tl) Flow Scintillation Analyser 150 TR de la société Packard Bioscience (Meriden, Connecticut - USA).

III.5.3. Résultats et discussion

Les résultats des tests de stabilité sériques sont donnés dans la figure n°58.

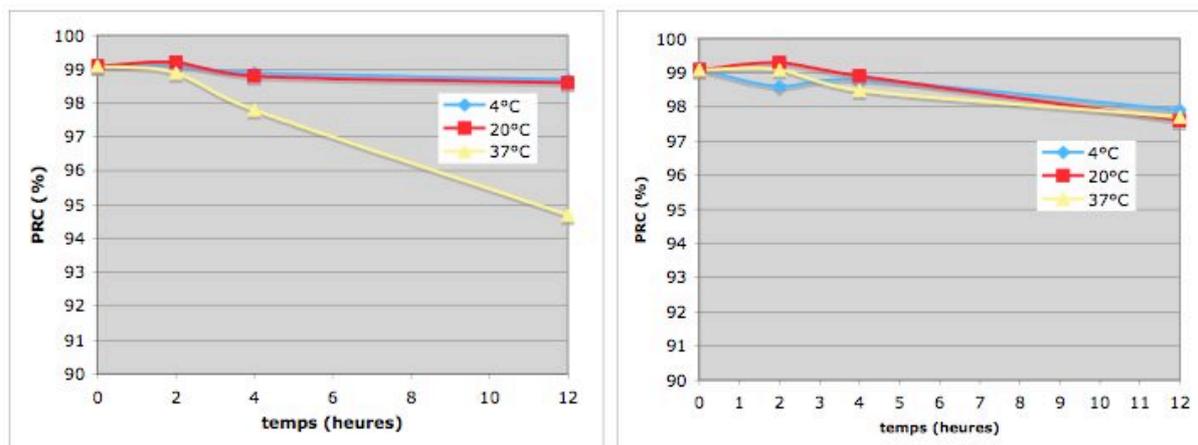


Figure n° 58 : Stabilité sérique d'une immunoglobuline marquée à l'astate-211. A gauche stabilité dans du sérum humain. A droite : stabilité en tampon phosphate.

Le test de stabilité montre une absence de variation de la pureté radiochimique en tampon phosphate à 4, 20 et 37°C attestant de la stabilité chimique *in vitro* de l'immunoglobuline marquée à l'astate-211. Le test en sérum humain montre une légère instabilité à 37°C avec 4 % d'activité libérée après 12 heures d'incubation. Cette instabilité ne se révélant qu'à 37°C laisse présumer une action enzymatique. Cette instabilité sérique, bien que non négligeable, est comparable à celle classiquement retrouvée dans la littérature.

Les profils d'élution à 6 et 12 heures sur colonne de gel exclusion sont donnés dans la figure n°59.

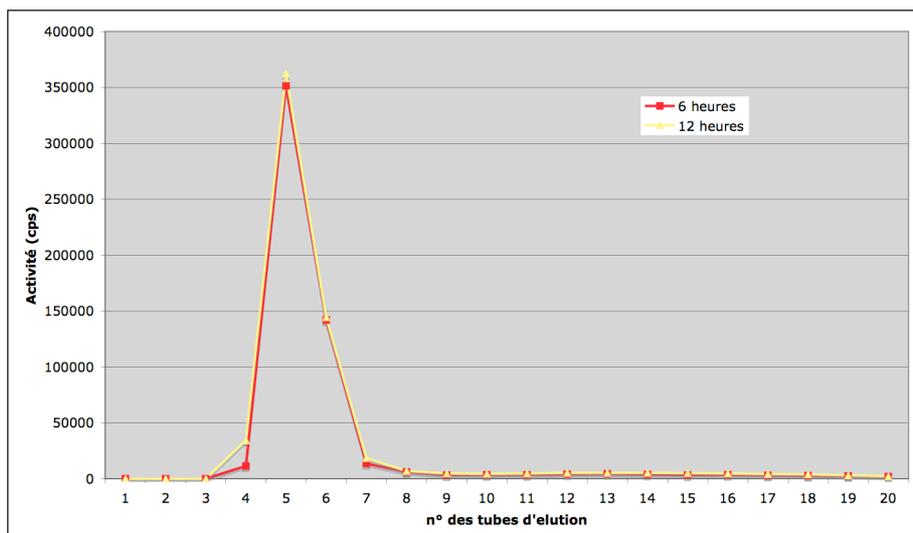


Figure n°59 : Profil d'élution sur colonne Sephadex® de type NAP-5 d'un mélange BSA / acide 3-[²¹¹At]astatobenzoïque après 6 et 12 heures d'incubation.

Les taux de fixation protéique estimés sont de 91,8 et 90,4 % après 6 et 12 heures d'incubation. Après précipitation de la fraction protéique, l'analyse du surnageant par HPLC montre un unique pic avec un temps de rétention de 9,2 minutes caractéristique de l'acide 3-[²¹¹At]astatobenzoïque.

Dans la mesure où l'action enzymatique peut libérer de l'astate-211 sous forme d'acide 3-[²¹¹At]astatobenzoïque, nous avons étudié la fixation non-covalente de cet acide à l'albumine. Les études ont démontré une très forte fixation de l'ordre de 90 % aux protéines plasmatiques. L'étude de précipitation des protéines montre que cette fixation est non-covalente et que l'albumine sert de transporteur sanguin au métabolite acide 3-[²¹¹At]astatobenzoïque. Cette forte fixation pourra potentiellement être la cause d'un temps relativement long de circulation de l'astate-211 dans le compartiment vasculaire avant son élimination.

III.6. Etude de l'immunoréactivité

III.6.1. Introduction

L'immunoréactivité représente la fraction d'une solution d'anticorps qui a gardé sa capacité à reconnaître son antigène spécifique correspondant. L'intérêt de ce test est de démontrer que l'anticorps radiomarqué à l'astate-211 n'a pas été rendu non fonctionnel par le marquage (fixation du groupement prosthétique au niveau des sites CDR de reconnaissance ou modification du repliement quaternaire de l'anticorps). Le test d'immunoréactivité est généralement réalisé en fixant l'antigène sur une phase solide (*coating* de tubes en plastique) et en ajoutant un défaut de l'anticorps correspondant. La phase solide permet de séparer aisément les complexes antigènes-anticorps, en retirant simplement le surnageant après lavages. Ce type de test est réalisé chaque fois que l'on dispose de l'antigène purifié. Dans le cas contraire, on peut pratiquer une étude d'immunoréactivité en pratiquant une technique de Lindmo [193] qui consiste à additionner une quantité fixe d'anticorps marqués à une concentration de 10 ng/mL sur une cascade de dilution de demi en demi d'une suspension cellulaire immunocompétente. En parallèle, on mesure par comptage la fixation non spécifique de l'anticorps sur les cellules. Après quatre heures d'incubation, les cellules de chaque échantillon sont séparées du surnageant par centrifugation et la radioactivité de chaque fraction est mesurée. La fraction immunoréactive est déterminée par extrapolation graphique des résultats obtenus pour une quantité infinie d'antigènes. Il est à noter que cette technique ne peut être réalisée en routine car elle nécessite une étape de culture cellulaire trop longue en regard de la demi-vie de l'astate-211. De plus, le fort taux de fixation aux protéines de l'acide 3-[²¹¹At]astatobenzoïque pouvant masquer une éventuelle instabilité par non différenciation des protéines radiomarquées (anticorps et albumine), nous avons affiné l'étude de stabilité au niveau du test d'immunoréactivité.

Dans la mesure où seul l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) spécifique des fragments F(ab')₂ de l'anticorps F6 était disponible au sein du laboratoire INSERM U892, nous avons effectué le test d'immunoréactivité sur un fragment F(ab')₂ marqué à l'astate-211. Afin de documenter une éventuelle différence de stabilité entre le groupement prosthétique *meta*-astatobenzoïque que nous avons utilisé jusqu'ici et le groupement *para*-astatobenzoate, nous avons mis à incuber en sérum humain les fragments F(ab')₂ marqués par ces 2 groupements. Les comportements de ces 2 méthodes de marquage ont été analysés par le test d'immunoréactivité.

III.6.2. Matériels et méthodes

L'ester 4-[²¹¹At]astatobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle marqué en position *para* du cycle benzoïque est préparé de façon similaire à l'ester 3-[²¹¹At]astatobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle synthétisé auparavant. Il est à noter que les méthodes chromatographiques utilisées ne permettent pas de différencier ces 2 produits. Les fragments F(ab')₂ de l'anticorps F6 sont marqués à l'astate et purifiés selon le protocole décrit précédemment. Les 2 composés ainsi marqués sont mis à incuber à 4°C et à 37°C dans 300 µL de sérum humain. Les immunoréactivités sont déterminées après 12 et 18 heures d'incubation.

L'immunoréactivité des immunoglobulines marquées à l'astate-211 est testée à l'aide de tubes Immuno Maxisorp 5 mL de la société VWR (Fontenay-Sous-Bois – France), préalablement recouverts d'antigènes par adsorption passive. 500 µL d'antigènes carcino-embryonnaire (ACE, spécifiques du fragment F(ab')₂ F6) à la concentration de 10 µg/mL en tampon phosphate 0,1 M pH = 7,2 sont déposés par tube. Après une nuit d'incubation à 37°C sous agitation douce, le surnageant est aspiré. Les tubes sont ensuite incubés 3 h à 37°C avec 500 µL d'une solution de sérum albumine bovine (BSA) à 0,5 % en PBS, dont le rôle est de saturer les sites de fixation non spécifique de l'antigène. Le surnageant est à nouveau aspiré et les tubes sont conservés à 4°C avec 500 µL de PBS-BSA 0,5%.

Juste avant d'effectuer le test d'immunoréactivité, le surnageant est aspiré. Les tubes sont lavés par avec 2 fois 750 µL de PBS-BSA 0,5%. 150 µL de solution à tester sont ajoutés à 500 µL de PBS-BSA 0,5% et cette solution est mise à incuber dans les tubes *coated* pendant 1 heure sous agitation à 37 °C. Chaque point de mesure est réalisé en triple exemplaire.

L'activité de chaque tube est comptée sur un gamma spectromètre NaI(Tl) de la société Raytest (Straubenhardt - Allemagne) puis le surnageant est aspiré. Après lavage par 2 fois 750 µL de PBS-BSA 0,5%, la radioactivité est à nouveau comptée. Le taux d'immunoréactivité est donné par le rapport du nombre de coups par minutes (cpm) avant lavage sur le nombre de cpm après lavage.

Les variances des évolutions des 4 couples de valeurs entre 12 et 18 heures sont comparées par un test de Fisher-Snedecor et les moyennes obtenues entre 12 et 18 heures sont comparées par un test de *t* de Student.

III.6.3. Résultats et discussion

Les tests d'immunoréactivité réalisés *in vitro* sont très importants pour vérifier qu'il existe toujours une bonne reconnaissance de l'immunoglobuline pour l'antigène afin d'envisager une utilisation *in vivo*.

L'immunoréactivité des fragments $F(ab')_2$ de l'anticorps F6 marqués par l'ester $[^{211}\text{At}]3$ -astatobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle est en moyenne de 80,2 +/- 4,5 % après 12 heures d'incubation sérique à 4°C et de 79,3 +/- 3,3 % après 12 heures d'incubation à 37°C. Après 18 heures d'incubation, la fraction incubée à 4°C présente une immunoréactivité de 76,8 +/- 3,0 % et la fraction incubée à 37°C montre une immunoréactivité de 72,2 +/- 6,5 %.

L'immunoréactivité des fragments $F(ab')_2$ de l'anticorps F6 marqués par l'ester 4- $[^{211}\text{At}]$ astatobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle est en moyenne de 90,2 +/- 3,2 % après 12 heures d'incubation sérique à 4°C et de 87,7 +/- 5,6 % après 12 heures d'incubation à 37°C. Après 18 heures d'incubation, la fraction incubée à 4°C présente une immunoréactivité de 94,6 +/- 2,2 % et la fraction incubée à 37°C montre une immunoréactivité de 80,1 +/- 4,7 %.

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure n°60.

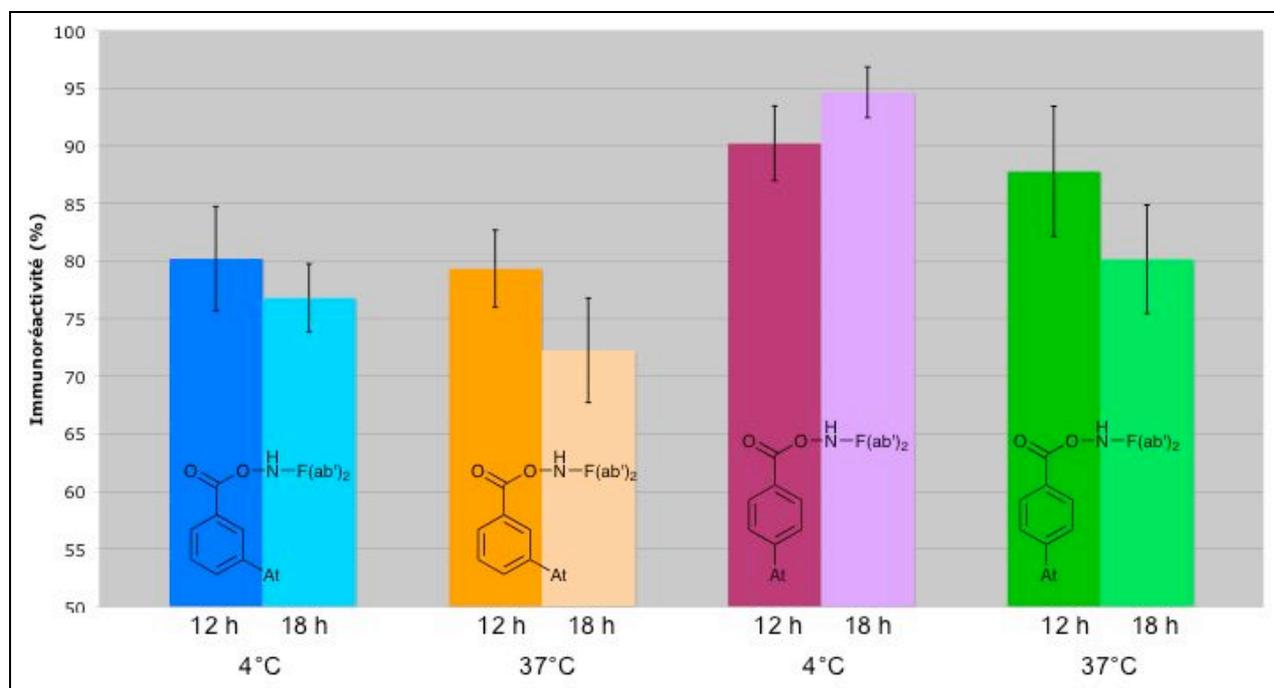


Figure n°60 : Résultats des tests d'immunoréactivité sur les fragments $F(ab')_2$ marqués par l'ester 3- $[^{211}\text{At}]$ astatobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle et 4- $[^{211}\text{At}]$ astatobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle en fonction du temps et de la température d'incubation.

Les comparaisons de variances par un test de Fisher-Snedecor sur l'évolution des valeurs entre 12 et 18 heures ne montrent pas de différences significatives pour les 2 marquages et les 2 températures. Les valeurs d'immunoréactivité entre 12 et 18 heures pour les 2 marquages et pour les 2 températures ne montrent pas non plus de différences (test *t* de student) significatives ($p > 0,05$).

Les résultats obtenus montrent une bonne immunoréactivité des anticorps marqués à l'astate-211 via un groupement prosthétique de type ester d'étain activé. En effet, l'utilisation d'un marquage à $\text{pH} = 8,5$ est un élément favorisant pour un radiomarquage sur les fonctions amines situées en ϵ des lysines plutôt que sur les résidus amines terminales de la chaîne peptidique dont le pH de couplage est proche de 7,0.

Cette étude montre que l'utilisation d'un groupement prosthétique marqué en *para* ou en *meta* conduit dans les 2 cas à une immunoréactivité compatible avec une utilisation clinique. Malgré une légère tendance en faveur d'une instabilité à 37°C laissant présumé d'une action enzymatique, les différences entre ces 2 temps expérimentaux ne sont pas statistiquement significatives ($p > 0,05$). De plus, cette étude n'a pas permis de démontrer une différence de stabilité entre le marquage en *para* et en *meta* du cycle benzénique à l'astate-211. Cette différence de stabilité supposée est couramment évoquée dans la littérature où les auteurs supposent que l'action enzymatique de déhalogénéation est favorisée lorsque l'halogène (l'iode le plus souvent) est situé en position *para*. Le fait que le comportement de l'astate ne montre pas de différence significative au niveau de cette comparaison peut être dû à la différence de polarité entre l'astate-211 et l'iode-125 limitant la reconnaissance du site actif de l'enzyme responsable de la déhalogénéation.

III.7. Étude *in vivo* de biodistribution

III.7.1. Introduction

Après les tests réalisés *in vitro*, nous avons souhaité étudier le devenir des anticorps radiomarqués à l'astate-211 après injection chez la souris afin de préciser la stabilité de l'immunoglobuline *in vivo* ainsi que ses lieux de fixation physiologique afin de déterminer les organes sains potentiellement irradiés lors d'un protocole ultérieur de radio-immunothérapie α . La détermination de la biodistribution est une étape essentielle pour le développement futur d'une étude clinique de radio-immunothérapie à l'astate-211.

Afin d'analyser le comportement de l'immunoglobuline marquée à l'astate-211 *in vitro* et de préciser les lieux de fixation et de métabolisation de cet anticorps, nous avons utilisé un modèle murin ne présentant pas de tumeurs spécifiques pour l'immunoglobuline (entière ou sous forme de fragment) utilisée.

III.7.2. Matériels et méthodes

III.7.2.1. Matières premières

L'immunoglobuline humanisée entière de type IgG1 hLL-2 dirigée contre l'antigène CD-22 présent à la surface de cellules tumorales dans les lymphomes malins non-hodgkinien (LMNH) est fournie par la société Immunomedics (Morris Plain, New Jersey – Etats Unis). Le fragment F(ab')₂ est issu de l'anticorps F₆ dirigé contre l'antigène carcino-embryonnaire extrait et purifié à partir d'un hybridome cultivé *in situ* au sein du laboratoire INSERM U892. Les études de biodistribution de références sont réalisées avec une immunoglobuline entière et sous forme de fragments marqués à l'iode-125 de façon analogue aux marquages à l'astate-211. Les études de biodistribution d'anticorps radiomarqués à l'astate-211 sont réalisées avec une immunoglobuline entière ou sous forme de fragments marqués par l'ester 3-[²¹¹At]astatobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle conformément aux procédures décrites ci desus.

L'étude *in vivo* est réalisée avec des souris BALB/c femelles saines de plus de 10 semaines dont les poids varient de 20 à 30 g provenant de la société Janvier (France).

III.7.2.2. Protocoles expérimentaux

Deux séries de 4 souris sont injectées par voie intra-veineuse dans une veine de la queue par respectivement 150 μL de fragments F(ab')_2 de l'anticorps F6 marqués à l'iode-125 et 150 μL d'immunoglobuline entière IgG de l'anticorps hLL2 marquée à l'iode-125. 2 souris de chaque lot sont sacrifiées 4 heures après l'injection et les 2 restantes après 24 heures. Après dislocation cervicale, on prélève le sang et les différents organes (foie, rein, intestin, poumon, muscle, rate, peau, cerveau, cœur, cou, os long et estomac). Les organes et les prélèvements sont pesés et leur radioactivité est mesurée au spectromètre γ NaI(Tl) de la société Raytest (Straubenhardt, Allemagne).

Cinq souris reçoivent par voie intra-veineuse dans une veine de la queue 150 μL de fragments F(ab')_2 de l'anticorps F6 marqués à l'astate-211. 3 souris sont sacrifiées 14 heures après l'injection et 2 souris sont sacrifiées après 20 heures. Après dislocation cervicale, on prélève le sang et les différents organes (foie, rein, intestin, poumon, muscle, rate, peau, cerveau, cœur, cou, os long et estomac). Les organes et les prélèvements sont pesés et leur radioactivité est mesurée au spectromètre γ NaI(Tl) de la société Raytest (Straubenhardt, Allemagne).

Huit souris reçoivent par voie intra-veineuse dans une veine de la queue 150 μL d'immunoglobuline entière hLL2 de type IgG marqués à l'astate-211. 4 souris sont sacrifiées 14 heures après l'injection et 4 souris sont sacrifiées après 20 heures. Après dislocation cervicale, on prélève le sang et les différents organes (foie, rein, intestin, poumon, muscle, rate, peau, cerveau, cœur, cou, os long et estomac). Les organes et les prélèvements sont pesés et leur radioactivité est mesurée au spectromètre γ NaI(Tl) de la société Raytest (Straubenhardt, Allemagne).

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu ou de sang (%DI/g). Les différences de temps de sacrifices des différents lots d'animaux sont dues aux contraintes réglementaires liées au travail nocturne au sein du laboratoire. En effet, l'iode-125 est disponible à tout moment de la journée et permet, avec un marquage d'immunovecteur fait le matin d'étudier la pharmacocinétique en temps précoce 4 heures après l'injection alors que l'astate-211 n'est disponible qu'à 14 heures pour injection à l'animal vers 18 heures et ne permet donc qu'une étude de biodistribution tardive 14 heures après l'injection à l'animal.

III.7.3. Résultats et discussion

Les résultats de biodistribution chez la souris après injection d'immunoglobuline entière IgG ou de fragments $F(ab')_2$ marqués à l'iode-125 sont présentés dans les figures 61 et 62. Les moyennes et écart-types ont été calculés sur des lots de 2 souris. Les résultats obtenus sont standard vis à vis des biodistributions et pharmacocinétiques attendues. On observe une élimination sanguine plus rapide pour le fragment $F(ab')_2$ que pour l'IgG entière et une fixation pulmonaire, hépatique et splénique. La fixation stomacale du fragment $F(ab')_2$ ne se manifeste pas par une fixation thyroïdienne (activité mesurée dans le cou) et laisse donc présager d'une éventuelle contamination due à la présence de sang dans les échantillons prélevés d'estomac.

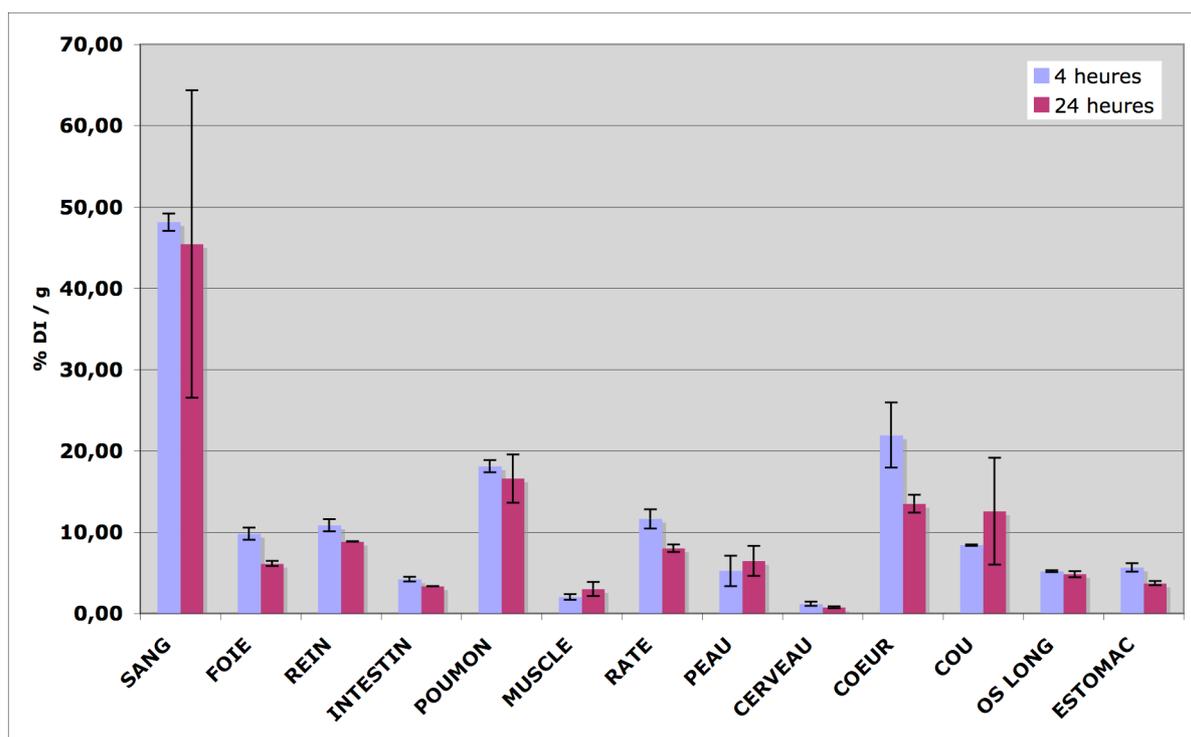


Figure n°61 : Biodistribution d'une IgG entière marquée à l'iode-125 représentée en pourcentage de dose injectée par gramme.

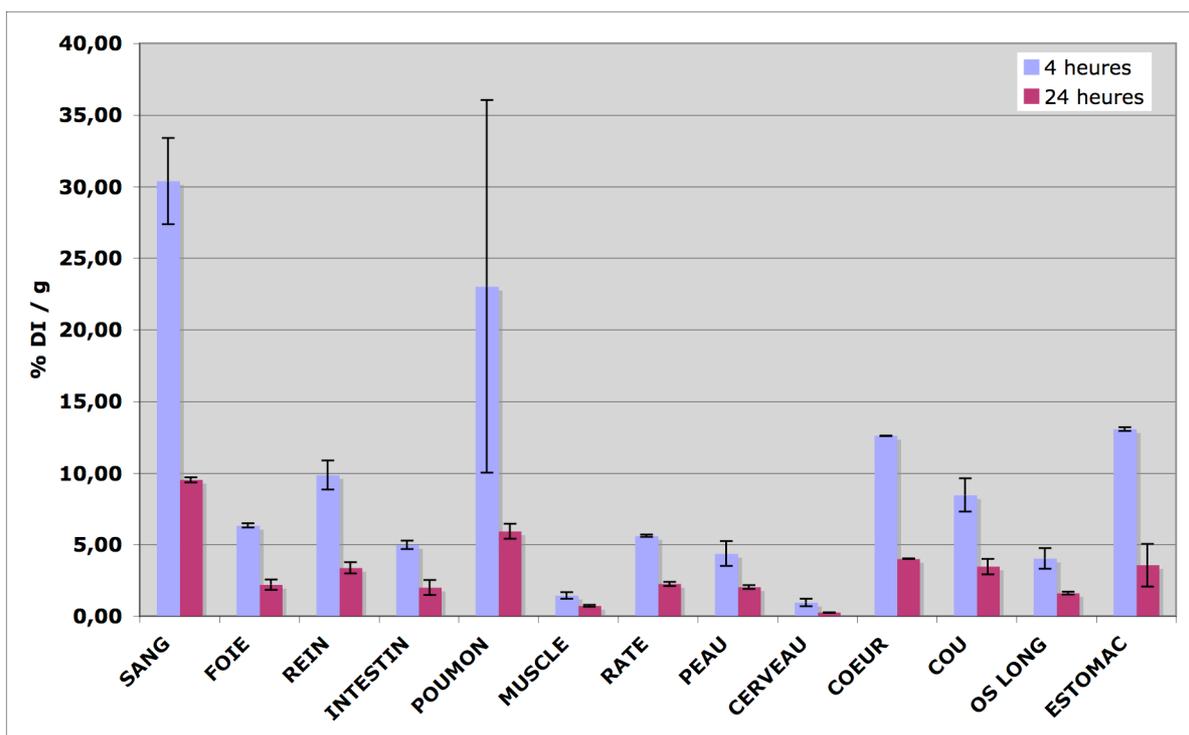


Figure n°62 : Biodistribution d'un fragment $F(ab')_2$ marqué à l'iode-125 représentée en pourcentage de dose injectée par gramme.

L'accumulation d'activité au niveau du cou pour l'immunoglobuline entière qui n'est pas retrouvée au niveau du fragment $F(ab')_2$ est vraisemblablement due à une métabolisation hépatique supérieure pour l'IgG qui va ainsi libérer de l'iode-125 libre s'accumulant dans la thyroïde. La fixation cutanée retrouvée chez les animaux peut être due à l'élimination d'iode-125 par la sueur, le léchage (accumulation connue de l'iode-125 au niveau des glandes salivaires [194]) ou par contamination urinaire. La fixation intestinale correspond à une fixation classique des anticorps monoclonaux consécutive au métabolisme de ce type de composé par les follicules lymphoïdes primaires et secondaires de l'intestin (plaque de Peyer). L'activité musculaire retrouvée est relativement faible et présente la même valeur que l'activité cérébrale représentant, dans le cas des études de biodistributions d'anticorps, le témoin négatif de fixation.

Les résultats de biodistribution chez la souris après injection d'immunoglobuline entière IgG marqués à l'astate-211 sont donnés dans la figure n°63. Les moyennes et écart-types sont calculés sur des lots de 4 souris. Les résultats obtenus montrent une cinétique d'élimination sanguine et une biodistribution similaire à celle observée pour la référence iodée et qui est cohérente avec les études de biodistribution observées dans la littérature [156, 195, 196].

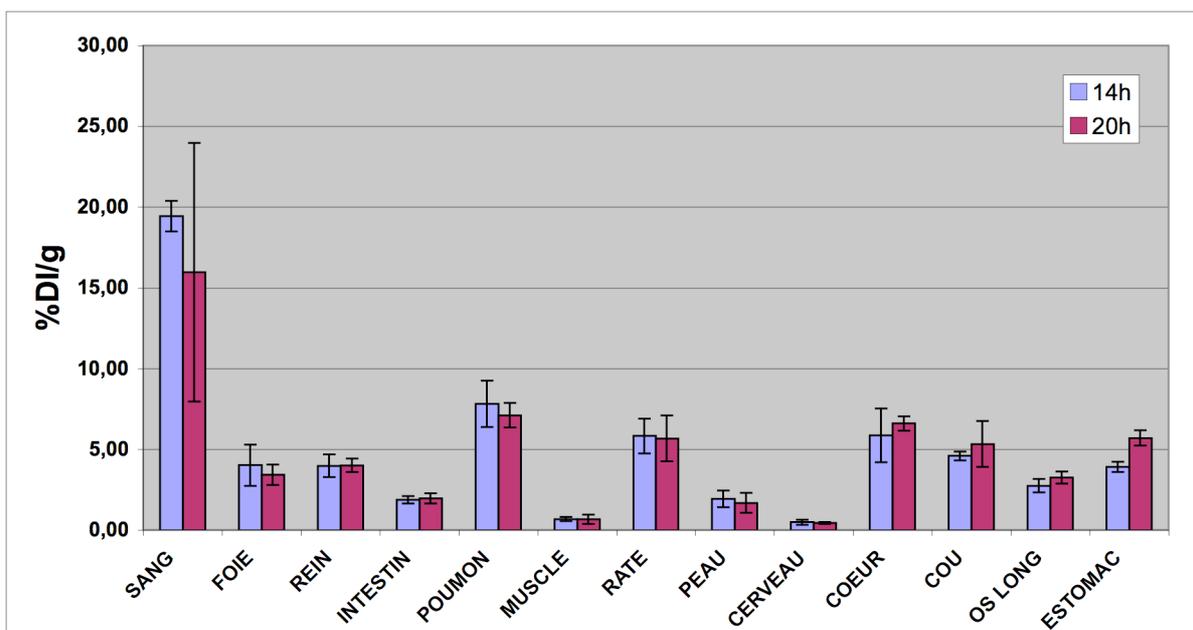


Figure n°63 : Biodistribution d'une IgG entière marquée à l'astate-211 représentée en pourcentage de dose injectée par gramme.

La faible fixation thyroïdienne (estimée par l'activité du cou) et stomacale signe une bonne stabilité *in vivo* du marquage. La fixation au niveau des différents organes connus comme étant des sites de métabolisation des anticorps (foie, rate, poumon) est une fixation normale faisant suite à l'injection d'un vecteur immunologique radiomarqué à l'astate-211. La fixation au niveau des différents organes peut faire suite à une fixation non spécifique de l'immunovecteur ou à une accumulation des catabolites radiomarqués à l'astate-211.

Il est à noter que l'acide *meta*-astatobenzoïque est plus lipophile que son homologue *meta*-iodobenzoïque (coefficient de partage octanol / eau de 38 et 6 respectivement) [156]. Cette différence de liposolubilité entre les références iodées et le produit marqué à l'astate-211 peut être à l'origine des différences observées par un meilleur passage intra-cellulaire du catabolite acide 3-[²¹¹At]astatobenzoïque expliquant la moindre fraction de dose injectée présente dans le sang (environ 2 fois moins que pour la référence marquée à l'iode-125). La moindre fixation au niveau du cou (et donc de la thyroïde) pour l'astate-211 est un phénomène connu et constamment retrouvé dans la littérature et peut être dû au fait que l'astate-211 n'est pas intégré aux hormones thyroïdiennes comme peut l'être l'iode-125. A l'inverse de l'iode-125 qui se fixe puis se résorbe au niveau de l'estomac, on observe une accumulation pour l'astate-211. En effet, si les deux halogènes peuvent être transportés dans le cytoplasme par le symporteur sodium / iode, il semble que le transport de l'astate-211 soit supérieur à celui de l'iode-125 [197]. La fixation cutanée retrouvée chez les animaux peut être due à l'élimination d'astate-211 par la sueur, le léchage (accumulation connue de l'iode-211 au niveau des glandes salivaires [198]) ou par contamination urinaire.

La fixation intestinale correspond à une fixation classique des anticorps monoclonaux consécutive au métabolisme de ce type de composé par les follicules lymphoïdes primaires et secondaires de l'intestin (plaque de Peyer). Enfin, comme dans le cas de la biodistribution de l'immunoglobuline entière marquée à l'iode-125, la non-fixation cérébrale (témoin négatif) est du même ordre de grandeur que la fixation musculaire.

Les résultats de biodistribution chez la souris après injection de fragments $F(ab')_2$ marqués à l'astate-211 sont donnés dans la figure n°64. Les moyennes et écart-types sont calculés sur des lots de 3 souris pour le prélèvement à 14 heures et sur des lots de 2 souris pour le prélèvement à 20 heures. Les résultats montrent une biodistribution intermédiaire entre celle de l'immunoglobuline entière marquée à l'astate-211 et la référence $F(ab')_2$ marquée à l'iode-125. Dans ce cas, on observe une fixation stomacale et thyroïdienne (estimée par l'activité dans le cou) similaire à celle observée avec la référence $F(ab')_2$ marquée à l'iode-125 démontrant un métabolisme plus important pour les fragments $F(ab')_2$ que pour les immunoglobulines entières de type IgG.

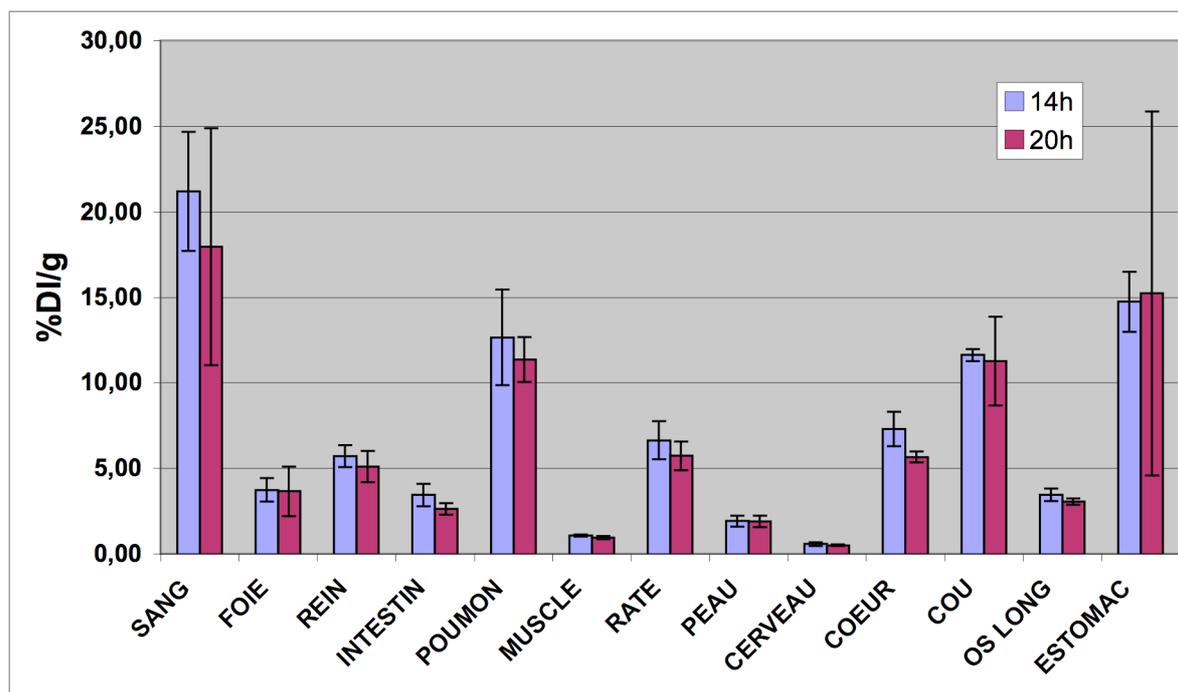


Figure n°64 : Biodistribution d'un fragment $F(ab')_2$ marqué à l'astate-211 représentée en pourcentage de dose injectée par gramme.

Au cours de cette étude *in vivo*, nous avons souhaité vérifier la possibilité d'injecter à un animal un vecteur immunologique marqué à l'astate-211 suffisamment stable *in vivo* pour envisager une application clinique de radio-immunothérapie α .

Les résultats ont montré dans le cas de l'immunoglobuline entière IgG une pharmacocinétique et une biodistribution similaires à celles qui sont observées avec les références iodées. Dans le cas du fragment F(ab')₂ marqué à l'astate-211, l'étude de biodistribution ne permet pas de conclure sur la différence pharmacocinétique avec une immunoglobuline entière dans la mesure où les temps de sacrifice pratiqués sont relativement longs par rapport à la pharmacocinétique de ce type d'immunovecteur. En effet, la réception de la cible en début d'après-midi engendre une injection chez l'animal en début de soirée difficilement compatible avec les horaires du personnel de l'animalerie.

DISCUSSION GENERALE

Chapitre IV. Discussion générale

L'objectif de ce travail de thèse a été de réaliser une étude de faisabilité de la radio-immunothérapie α à l'aide d'astate-211 obtenu à partir d'une extraction liquide. L'étude expérimentale a été divisée en cinq parties distinctes :

- extraction liquide de la cible,
- radiomarquage du groupement prosthétique,
- couplage du groupement prosthétique à une structure protéique,
- étude de stabilité *in vitro*,
- étude *in vivo* de biodistribution.

Chaque partie a donné lieu à une discussion essayant d'expliquer les résultats obtenus. La discussion générale va permettre de reprendre les résultats essentiels de chaque partie et de les comparer à ceux qui sont décrits dans la littérature. Nous traiterons d'une part, les voies d'optimisation du radiomarquage d'une protéine de type immunoglobuline à l'astate-211 et d'autre part, les études de stabilité (*in vitro* et *in vivo*) et de biodistribution (*in vivo*).

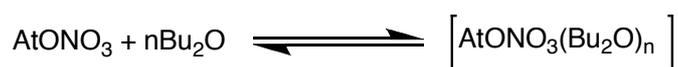
IV.1. Optimisation du radiomarquage d'une immunoglobuline à l'astate-211

Les diverses publications parues à ce jour sur les essais de radio-immunothérapie α à l'astate-211 utilisent la sublimation de l'astate-211 depuis la cible solide de production cyclotron et il n'a jamais été possible de marquer une structure protéique à partir d'astate-211 obtenu par attaque acide de la cible [89].

La voie d'extraction liquide de l'astate-211 par attaque acide de la cible a été traitée en collaboration avec le laboratoire Subatech de l'Ecole des Mines de Nantes. Cette méthode permet d'obtenir de l'astate-211 en phase di-isopropylether / acide nitrique avec de très bons rendements de l'ordre de 90 % en 1 h 15 minutes comparativement à ceux qui sont obtenus par voie sèche de sublimation de la cible (70 % en 30 minutes) [87, 88] qui, en outre, s'avèrent peu répétables à haute activité [89]. Cette technique d'extraction permet d'extraire l'astate-211 avec une grande pureté radiochimique par élimination des impuretés radionucléidiques issues de l'activation du cuivre (gallium-67, zinc-65, bismuth-207 et indium-111).

L'inconvénient majeur de cette voie d'extraction réside sur l'incertitude de la forme chimique de l'astate dans la phase di-isopropylether / acide nitrique avec, une forme polaire observée extemporanément à l'extraction évoluant vers une forme apolaire vraisemblablement de type complexé. Cette évolution de la forme chimique de l'astate au cours du temps est un phénomène potentiellement dû à une réduction de l'astate par les impuretés présentes dans la phase di-isopropylether. Cette hypothèse semble toutefois peu probable dans la mesure où les impuretés potentielles sont de types peroxydes d'alkyles qui sont des espèces chimiques oxydantes et non réductrices. Une hypothèse plus vraisemblable à la raison de ce changement de forme chimique de l'astate est une radiolyse du solvant sous particules α . La dose absorbée (D) dans 500 μ L de di-isopropylether est de 0,15 Gy/MBq.min ce qui équivaut à une dose de 205 Gy pour une extraction de 48 MBq conservée pendant 30 minutes [159]. Cette dose absorbée est suffisante pour engendrer différentes espèces réductrices comme l'hydrogène naissant $H\cdot$, des radicaux libres de l'isopropanol ($(CH_3)_2CHO\cdot$), de l'acétaldéhyde et de l'acétone [199, 200].

Une étude de la littérature sur la forme potentielle de ce complexe d'astate montre que l'astate, en présence d'acide nitrique, prend une forme de type $AtONO_3$ ou AtO_2^+ présentant respectivement les degrés d'oxydoréduction +III et +V et que ces différentes formes chimiques peuvent être solvatées par différents solvants de type dibutylether (Bu_2O) ou di-isopropylether conduisant aux espèces suivantes [89, 201] :



Il a été remarqué que la présence de l'acide nitrique dans la phase di-isopropylether est indispensable à la réussite du marquage. Ce fait peut être expliqué par la polarité nécessaire à la réaction de substitution électrophile apportée par l'acide nitrique ou par une hydrolyse potentielle du cation At^+ à des pH moins acides.

Malgré les incertitudes sur la forme exacte de l'astate-211 obtenue par voie liquide, on constate que l'extraction depuis la phase acide d'attaque augmente avec la polarité du solvant et avec l'acidité du pH [187].

Contrairement à l'iode qui peut être couplé de façon directe à une structure protéique (par substitution électrophile sur un cycle tyrosyle ou histidyle), l'astate requiert l'utilisation d'un groupement prosthétique bifonctionnel de type ester 3-triméthylstannylbenzoate de N-hydroxysuccinimidyle qui permet en 2 étapes le marquage d'une immunoglobuline. Ce groupement prosthétique n'est pas disponible au niveau commercial mais sa synthèse est relativement bien décrite et permet d'obtenir le produit de façon pur en 2 étapes avec un rendement de l'ordre de 81 %. Afin de vérifier la faisabilité de la première étape consistant en une halogéno-déstannylation, nous avons synthétisé des références marquées à l'iode-125 qui ont présenté les mêmes caractéristiques chromatographiques que les produits marqués à l'astate-211. Les différentes études visant à optimiser les paramètres du marquage du groupement prosthétique à l'astate-211 ont conduit à des rendements de marquage répétables de l'ordre de 80 à 90 % avec $1,65 \cdot 10^{-4}$ M d'ester 3-triméthylstannylbenzoate de N-hydroxysuccinimidyle, $8,27 \cdot 10^{-4}$ M (5 équivalents) d'agent oxydant (N-chlorosuccinimide) en 15 minutes dans un volume réactionnel le plus faible possible. Il est à noter que ce rendement de marquage est indépendant de la forme initiale sous laquelle se trouve l'astate car il est retrouvé quel que soit le délai observé entre l'extraction et la réaction de marquage.

Les rendements obtenus de cette manière sont similaires à ceux qui sont obtenus dans la littérature lorsque l'astate-211 est obtenu par sublimation [161]. Il est à noter que dans notre étude, la réaction se déroule avec une forte concentration d'acide nitrique (3 M) dont la présence semble nécessaire à une bonne cinétique réactionnelle mais qu'il faudra éliminer lors du couplage à une structure protéique pouvant être dénaturé à un pH aussi acide.

La seconde étape de marquage d'une immunoglobuline à l'astate-211 consistant à coupler l'ester 3-[^{211}At]astatobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle sur une lysine (présence d'une fonction amine en ϵ), nous avons étudié le comportement de ce groupement prosthétique au pH du couplage. Il s'avère qu'à ce pH de 8,5, l'ester s'hydrolyse en acide 3-[^{211}At]astatobenzoïque en une dizaine de minutes et que cette forme acide est non couplable à une structure protéique. La réaction de couplage s'avère donc être en compétition avec l'hydrolyse de la forme ester fonctionnelle. Une étude des différents paramètres de couplage entre l'ester 3-[^{125}I]iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle et une immunoglobuline a démontré que cette réaction se déroule avec les meilleurs rendements (de 30 à 40 %) lorsque la réaction se déroule à 37°C en 15 minutes à pH = 8,5 avec la plus forte concentration d'anticorps possible. Après élimination de l'acide nitrique présent dans le milieu d'extraction de l'astate (et donc par conséquent dans le milieu de synthèse de l'ester

3-^[211At]astatobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle) à l'aide d'une purification sur colonne SepPak C₁₈, nous avons obtenu des rendements de couplage variant entre 40 et 70 % en fonction de la concentration initiale en anticorps. Cette concentration initiale joue un rôle non négligeable dans la mesure où elle pré-détermine l'activité spécifique finale (variant de 10 à 35 MBq/mg) représentant le nombre d'anticorps marqué à l'astate-211 par rapport au nombre total d'anticorps. Le seul moyen de conserver une haute activité spécifique en rapport avec la concentration en immunoglobuline serait d'augmenter la quantité radioactive d'astate-211 initiale. Dans nos conditions expérimentales, nous sommes limités par cette quantité initiale d'astate-211 produite par le cyclotron CEMHTI/CNRS d'Orléans. En effet, la quantité produite est limitée à la fois par les seuils imposés par la législation des transports de matières radioactives (colisage de type UN 2910 : quantités limitées en colis exceptés) ainsi que par la « faible » puissance d'irradiation du cyclotron (2 μ A à 28 MeV) qui imposerait, pour une production supérieure d'augmenter le temps d'irradiation engendrant *de facto* certains problèmes logistiques.

L'immunoglobuline marquée à l'astate-211 que nous avons obtenu lors de ce travail de thèse présente une pureté radiochimique suffisante (97,1 % en moyenne) pour être utilisée lors d'expérimentations animales ultérieures. De plus, une analyse radiochromatographique de l'anticorps ainsi marqué révèle un seul et unique pic caractéristique d'une forme chimique monomérique et non précipité dans la solution potentiellement injectable.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à une technique « classique » d'halogénéation des protéines basée sur l'utilisation d'ester d'étain activé mais d'autres voies reposant sur la chimie métallique de l'astate (complexation) ou sur de nouvelles techniques de couplage à une structure protéique (comme la « click chemistry » par exemple) sont envisageables tant au niveau de la simplification de la technique de marquage que de l'amélioration de la stabilité *in vivo*.

IV.2. Études de stabilité et de biodistribution.

La stabilité du marquage entre l'immunoglobuline et l'astate-211 est un facteur prépondérant dans la réussite clinique de la radio-immunothérapie α . En effet, si la liaison entre le radionucléide et son vecteur s'avère instable, l'isotope suit son propre métabolisme et on observe une irradiation non spécifique au niveau des tissus sains. Comparativement aux analogues iodés, il est fort probable que le catabolisme d'un anticorps radio-marqué à l'astate-211 présente deux catabolites essentiels : l'astate-211 et l'acide 3-[²¹¹At]astatobenzoïque et ses dérivés (astatohippurate et astatobenzoylglucuronide). Les études de stabilité de l'immunoglobuline radiomarquée ont permis de démontrer une légère instabilité (4 % de l'activité) d'ordre enzymatique lors de la conservation dans du sérum humain incubé à 37 °C pendant 12 heures. Cette instabilité est du même ordre de grandeur que celle qui est retrouvée dans la littérature [178, 179, 202]. Ce test ne pouvant discriminer la fixation de l'astate-211 (ou de l'acide 3-[²¹¹At]astatobenzoïque) à une autre structure protéique que celle de l'anticorps, une étude de la fixation de l'acide 3-[²¹¹At]astatobenzoïque sur l'albumine sérique a démontré une très forte fixation aux protéines plasmatiques de l'ordre de 90 à 92 %. La fixation de l'astate-211 libre aux protéines plasmatiques s'effectue par l'intermédiaire des groupements sulfhydriles de la protéine pouvant complexer des éléments chimiques présentant des caractéristiques métalliques comme l'astate.

Dans la mesure où l'astate libre et l'acide 3-[²¹¹At]astatobenzoïque se fixent de façon non spécifique à l'albumine sérique, l'étude de la stabilité a été affinée par une étude d'immunoréactivité permettant de vérifier les capacités fonctionnelles de l'anticorps au niveau de sa reconnaissance du site antigénique. Cette étude d'immunoréactivité a montré, comme l'étude de stabilité sérique initiale, une légère instabilité de l'ordre de 5 à 6 % sans différence statistique significative entre 12 et 18 heures d'incubation à 37 °C en sérum humain. Cette étude d'immunoréactivité n'a pas permis de démontrer une différence de stabilité entre les formes d'immunoglobulines marquées en *para* (4-[²¹¹At]astatobenzoïque) et les formes marquées en *meta* (3-[²¹¹At]astatobenzoïque) réputées pourtant plus stable au niveau de la littérature.

L'étude d'immunoréactivité a donné des résultats de l'ordre de 80 % signant une bonne capacité fonctionnelle de l'anticorps à reconnaître spécifiquement l'antigène contre lequel il est dirigé. Cette notion est primordiale en vue d'une utilisation clinique car le marquage à l'aide d'un radionucléide ne doit en cas rendre l'immunoglobuline inopérante.

L'étude de biodistribution *in vivo* dans un modèle murin non pathologique a permis de démontrer une bonne stabilité *in vivo* de l'immunoglobuline marquée à l'astate-211 sans relargage d'halogène excessif (faible fixation non spécifique au niveau de la thyroïde et de l'estomac). La pharmacocinétique d'élimination sanguine de l'anticorps ou du fragment F(ab')₂ utilisé est classique vis à vis des pharmacocinétiques classiques de ce type de vecteur avec une fixation au niveau des organes riches en macrophages (foie, rate et poumons) ainsi qu'une élimination de la radioactivité par voie urinaire (acide 3-[²¹¹At]astatobenzoïque).

IV.3. Perspectives

En ce qui concerne le radiomarquage d'une immunoglobuline à l'astate-211, nous avons mis au point une technique permettant d'obtenir un anticorps radiomarqué présentant une pureté radio-chimique moyenne de 97,1 % en 2 h 30 (à partir de la réception d'une cible solide d'astate-211). Les activités obtenues jusqu'à maintenant sont de l'ordre de 10 à 15 MBq pour une activité spécifique maximale de l'ordre de 37 MBq/mg. La technique de marquage employée a été optimisée mais reste limitée par le fait que la concentration d'anticorps lors du couplage doit être suffisamment grande (de l'ordre de 2 mg/mL) pour avoir un rendement de couplage de 50 % et que cette grande quantité induit une faible activité spécifique du produit final. Le composé obtenu reste potentiellement utilisable lors d'études pré-cliniques de radio-immunothérapie α à l'astate-211 sur des modèles animaux porteurs de xénogreffes de tumeurs humaines.

Afin de pouvoir passer à une phase clinique, il est important d'augmenter l'activité totale lors de l'injection (de l'ordre de 370 MBq [159]) tout en conservant une activité spécifique raisonnable à une application clinique (de l'ordre de 130 kBq/ μ g [203]). Pour ce faire, il faudra développer une technique de marquage à partir de cible dont l'activité sera plus grande issue notamment du cyclotron ARRONAX installé sur Nantes qui présente une haute énergie et une haute intensité en accélération de particules α . Ce type de marquage à haute activité devra être automatisé afin de minimiser l'irradiation du personnel et l'une des voies envisageables pour la synthèse de l'ester 3-[²¹¹At]astatobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle repose sur la chimie en phase solide où la fonction triméthylstannyl est liée de façon covalente à une résine plastique de type polystyrène [204]. Le marquage du groupement prosthétique s'effectuant par simple élution de la colonne contenant cette résine.

CONCLUSION

La radio-immunothérapie exploite la haute spécificité entre un antigène tumoral et un anticorps dirigé contre cet antigène pour vectoriser un radioisotope thérapeutique au niveau de la tumeur à détruire. Au cours de la dernière décennie, on a vu augmenter progressivement l'intérêt pour les radionucléides hautement radio-toxiques émetteurs de particules α . D'un point de vue thérapeutique, la radio-immunothérapie α s'adresse particulièrement aux pathologies cancéreuses intrinsèquement de petite taille comme les hémopathies malignes, les micro-métastases ou la maladie résiduelle. Néanmoins, d'autres stratégies de ciblage comme le micro-environnement tumoral peuvent être envisagées.

L'astate, élément 85, est le plus lourd des halogènes et sa chimie n'est pas parfaitement connue dans la mesure où aucun des isotopes de cet élément n'est stable. Parmi les différents isotopes de cet élément, les propriétés physiques de l'astate-211 comme sa demi-vie et ses caractéristiques d'émissions (émission thérapeutique de particules α mais aussi de rayonnements X pour une imagerie dosimétrique) ainsi que ses propriétés chimiques se rapprochant de l'iode dont l'utilisation est courante en radiopharmacie font de ce radionucléide l'un des plus prometteur en vue d'applications cliniques de radio-immunothérapie α .

Ce travail, basé sur une approche originale d'extraction liquide de l'astate, montre qu'il est possible de radiomarquer facilement une immunoglobuline à l'astate-211 en 2 étapes avec des rendements élevés par l'intermédiaire d'un groupement prosthétique de type ester d'étain activé. Il a été démontré au cours de nos différentes études que l'immunoglobuline est effectivement radio-marquée et que son immunoréactivité est conservée. La technique de marquage mise au point au cours de ce travail de thèse permet d'obtenir de façon répétable des activités permettant d'envisager une étude pré-clinique approfondie de ciblage tumoral spécifique sur un modèle murin porteur d'une pathologie cancéreuse humaine mais le développement est aujourd'hui freiné par les activités en astate-211 disponible. Cette problématique de logistique d'approvisionnement est en passe d'être levée avec l'installation sur Nantes d'un cyclotron de haute énergie et de haute intensité permettant à terme de produire des activités suffisantes pour affiner les données pré-cliniques. La méthode développée présente l'avantage d'être polyvalente et de pouvoir s'adapter à différents types de vecteur immunologique et ainsi de pouvoir être utilisée dans différentes indications thérapeutiques.

Les études menées chez l'animal ont démontré la stabilité des marquages *in vivo* et laissent ainsi entrevoir un avenir prometteur à la radio-immunothérapie α comme traitement adjuvant (ou néo-adjuvant) dans l'arsenal anti-cancéreux disponible en clinique. Les

résultats encourageants de cette étude de biodistribution permettent d'envisager un travail pré-clinique chez des animaux porteurs d'une xénogreffe tumorale afin de valider la faisabilité d'une administration systémique d'une immunoglobuline radiomarquée à l'astate-211 issu d'une extraction liquide.

Parmi les études envisagées à la suite de ce travail de thèse, il semble important de continuer à optimiser le marquage de l'immunoglobuline afin de pouvoir transposer aisément les marquages à faibles activités que nous avons mis au point vers les marquages à hautes activités nécessaire à l'activité clinique envisagée. D'autres études concernant la chimie de l'astate doivent être menées en parallèle de manière à augmenter encore la stabilité *in vivo* et à sécuriser l'utilisation de la radio-immunothérapie α chez l'humain.

BIBLIOGRAPHIE

1. Becker C: **La médecine nucléaire: de la radioactivité à la naissance d'une spécialité. 50 ans de médecine à l'UCL (1950-2000).** <http://www.md.ucl.ac.be/histoire/livre/mnuc.pdf> 2000.
2. Lacave R, Larsen C, Robert J: **Radiobiologie appliquée à la radiothérapie des cancers.** Dans *Cancérologie fondamentale*. John Libbey Eurotext. 2005:395-402.
3. Ershov B, Gordeev A: **A model for radiolysis of water and aqueous solutions of H₂, H₂O₂ and O₂.** *Radiation Physics and Chemistry* 2008, **77**:928-935.
4. Kassis A, Adelstein S: **Radiobiologic principles in radionuclide therapy.** *J Nucl Med* 2005, **46**:4S-12S.
5. Pouget J, Mather S: **general aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2001, **28**:541-561.
6. Hall EJ: **Chap 2. DNA Strand breaks and chromosomal aberrations.** Dans *Radiobiology for the radiobiologist 5th Edition*. Lippincott Williams & Wilkins. 2000:17-31.
7. Nelson D, Cox M: **Chap 8. Nucleotides and nucleic acids.** Dans *Lehninger biochemistry 4th edition*. 2005:273-305.
8. Lacave R, Larsen C, Robert J: **Le cycle de division cellulaire et sa régulation.** Dans *Cancérologie fondamentale*. John Libbey Eurotext. 2005:19-29.
9. Harrison's: **Cancer cell biology and angiogenesis.** Dans *Principles of internal medicine 16th edition*. McGraw Hill. 2004:453-464.
10. Lodish H, Berk A, Zipursky S, et coll.: **Regulating the eukaryotic cell cycle.** Dans *Molecular cell biology 5th edition*. W.H. Freeman and Co; 2000:853-897.
11. Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB: **Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992, **89**:7491–7495.
12. Hall EJ: **Chap 10. Radiation carcinogenesis.** Dans *Radiobiology for the radiobiologist 5th Edition*. Lippincott Williams & Wilkins; 2000:144-165.
13. Hall EJ: **Chap 8. Acute effects of total body irradiation.** Dans *Radiobiology for the radiobiologist 5th Edition*. Lippincott Williams & Wilkins; 2000:124-135.
14. Morère PJ, Piccart M, Nabholz J: **Mécanismes biologiques des effets tardifs des radiations ionisantes.** Dans *Thérapeutique du cancer*. Springer; 2001:263-274.
15. Hall EJ: **Chap 3. Cell Survival Curves.** Dans *Radiobiology for the radiobiologist 5th Edition*. Lippincott Williams & Wilkins. 2000:32-50.
16. Brown JM, Wilson WR: **Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**:437-447.

17. ICRP: **ICRP Publication 103: Chapters 3 and 4.** *Annals of the ICRP* 2007, **37**:49-79.
18. Valentin J: **ICRP Publication 92: Relative biological effectiveness (RBE), quality factor (Q), and radiation weighting factor (wR).** *Annals of the ICRP* 2003, **33**:1-121.
19. Loevinger R, Budinger T, Watson E: **MIRD primer for absorbed dose calculations, Revised edition.** *New York: Society of Nuclear Medicine* 1991.
20. Wiseman GA, White CA, Sparks RB, et coll.: **Biodistribution and dosimetry results from a phase III prospectively randomized controlled trial of Zevalin radioimmunotherapy for low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma.** *Crit. Rev. Oncol. Hematol* 2001, **39**:181-194.
21. Murray RK, Granner DK, Harper HA, Mayes PA, Rodwell VW: **Plasma proteins & immunoglobulins.** Dans *Harper's illustrated biochemistry 26th edition.* 2003:580-597.
22. Dreyer WJ, Bennett JC: **The molecular basis of antibody formation: a paradox.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1965, **54**:864-869.
23. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et coll.: **23. The immune system.** Dans *Molecular Biology of the Cell 4th Edition.* 2002:2211-2330.
24. KOHLER G, MILSTEIN C: **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.** *Nature* 1975, **256**:495-497.
25. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA: **Immunoglobulines: Structure et fonction.** Dans *Immunologie : Le cours de Janis Kuby.* 6 edition. Dunod; 2008:83-113.
26. Langmuir VK, Mendonca HL, Woo DV: **Comparisons between Two Monoclonal Antibodies That Bind to the Same Antigen but Have Differing Affinities: Uptake Kinetics and 125I-Antibody Therapy Efficacy in Multicell Spheroids.** *Cancer Res* 1992, **52**:4728-4734.
27. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA: **Organisation et expression des gènes des immunoglobulines.** Dans *Immunologie : Le cours de Janis Kuby.* 6 edition. Dunod; 2008:115-147.
28. Goldenberg D: **Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies.** *J Nucl Med* 2002, **43**:693-713.
29. Dearling J, Pedley R: **Technological advances in radioimmunotherapy.** *Clinical Oncology* 2007, **19**:457-469.
30. Bardies M, Faivre-Chauvet A: **Sélection des radioéléments pour la radiothérapie interne.** Dans *Radiopharmaceutiques, chimie des radiotraceurs et applications biologiques.* Presses Universitaires de Grenoble. 1998:673-685.
31. Bischof-Delaloye A: **Radio-immunothérapie: l'option thérapeutique moderne dans le traitement des lymphomes non-hodgkiniens.** Dans *Schering.* 2006:1-20.

32. Less JR, Skalak TC, Sevick EM, Jain RK: **Microvascular Architecture in a Mammary Carcinoma: Branching Patterns and Vessel Dimensions.** *Cancer Res* 1991, **51**:265-273.
33. Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, et coll.: **Pathology: Cancer cells compress intratumour vessels.** *Nature* 2004, **427**:695.
34. Minchinton AI, Tannock IF: **Drug penetration in solid tumours.** *Nat Rev Cancer* 2006, **6**:583-592.
35. Jain RK, Munn LL, Fukumura D: **Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**:266-276.
36. Brown JM, Giaccia AJ: **The Unique Physiology of Solid Tumors: Opportunities (and Problems) for Cancer Therapy.** *Cancer Res* 1998, **58**:1408-1416.
37. Davies CDL, Berk DA, Pluen A, Jain RK: **Comparison of IgG diffusion and extracellular matrix composition in rhabdomyosarcomas grown in mice versus in vitro as spheroids reveals the role of host stromal cells.** *Br J Cancer* 2002, **86**:1639-1644.
38. Leu AJ, Berk DA, Lymboussaki A, Alitalo K, Jain RK: **Absence of Functional Lymphatics within a Murine Sarcoma: A Molecular and Functional Evaluation.** *Cancer Res* 2000, **60**:4324-4327.
39. Lacave R, Larsen C, Robert J: **Immunologie de tumeurs.** Dans *Cancérologie fondamentale.* 2005:384-394.
40. De Plaen E, Traversari C, Gaforio JJ, et coll.: **Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family.** *Immunogenetics* 1994, **40**:360-369.
41. Chen J, Wu H, Han D, Xie C: **Using anti-VEGF McAb and magnetic nanoparticles as double-targeting vector for the radioimmunotherapy of liver cancer.** *Cancer Lett* 2006, **231**:169-175.
42. Imbert-Marcille BM, Thédrez P, Saï-Maurel C, et coll.: **Modulation of associated ovarian carcinoma antigens by 5 cytokines used as single agents or in combination.** *Int. J. Cancer* 1994, **57**:392-398.
43. Fujimori K, Covell D, Fletcher J, Weinstein J: **Modeling analysis of the global and microscopic distribution of immunoglobulin G, F(ab')₂, and Fab in tumors.** *Cancer Research* 1989, **49**:5656-5663.
44. Von Osdol W, Fujimori K, Weinstein J: **An analysis of monoclonal antibody distribution in microscopic tumor nodules: consequences of a "binding site barrier".** *Cancer Research* 1991, **51**:4776-4784.
45. GlaxoSmithKline Inc.: **Thérapie BEXXAR.** *Monographie de produit* 2006:1-47.
46. Witzig TE, Gordon LI, Cabanillas F, et coll.: **Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab**

immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol* 2002, **20**:2453-2463.

47. Bayer Shering Pharma: **Zevalin (Ibritumomab tiuxetan 90-Y).** *Résumé des Caractéristiques du Produit* 2004:1-38.

48. Press OW: **Evidence mounts for the efficacy of radioimmunotherapy for B-cell lymphomas.** *J. Clin. Oncol* 2008, **26**:5147-5150.

49. Jacobs SA, Swerdlow SH, Kant J, et coll.: **Phase II trial of short-course CHOP-R followed by 90Y-ibritumomab tiuxetan and extended rituximab in previously untreated follicular lymphoma.** *Clin. Cancer Res* 2008, **14**:7088-7094.

50. Oriuchi N: **[Radioimmunotherapy of low-grade B-cell lymphoma with (90)Y-labeled anti-CD20 monoclonal antibody (Zevalin)].** *Nippon Hoshasen Gijutsu Gakkai Zasshi* 2009, **65**:367-371.

51. Raetz EA, Cairo MS, Borowitz MJ, et coll.: **Chemoimmunotherapy reinduction with epratuzumab in children with acute lymphoblastic leukemia in marrow relapse: a Children's Oncology Group Pilot Study.** *J. Clin. Oncol* 2008, **26**:3756-3762.

52. Bodet-Milin C, Kraeber-Bodéré F, Dupas B, et coll.: **Evaluation of response to fractionated radioimmunotherapy with 90Y-epratuzumab in non-Hodgkin's lymphoma by 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography.** *Haematologica* 2008, **93**:390-397.

53. Supiot S, Faivre-Chauvet A, Couturier O, et coll.: **Comparison of the biologic effects of MA5 and B-B4 monoclonal antibody labeled with iodine-131 and bismuth-213 on multiple myeloma.** *Cancer* 2002, **94**:1202-1209.

54. Barbet J, Kraeber-Bodéré F, Vuillez JP, et coll.: **Pretargeting with the affinity enhancement system for radioimmunotherapy.** *Cancer Biother. Radiopharm* 1999, **14**:153-166.

55. Jhanwar Y, Divgi CR: **Current status of therapy of solid tumors.** *J Nucl Med* 2005, **46**:141s-150s.

56. Paganelli G, Magnani P, Zito F, et coll.: **Three-step monoclonal antibody tumor targeting in carcinoembryonic antigen-positive patients.** *Cancer Res* 1991, **51**:5960-5966.

57. Paganelli G, Bartolomei M, Ferrari M, et coll.: **Pre-targeted locoregional radioimmunotherapy with 90Y-biotin in glioma patients: phase I study and preliminary therapeutic results.** *Cancer Biother. Radiopharm* 2001, **16**:227-235.

58. Breitz HB, Weiden PL, Beaumier PL, et coll.: **Clinical optimization of pretargeted radioimmunotherapy with antibody-streptavidin conjugate and 90Y-DOTA-biotin.** *J. Nucl. Med* 2000, **41**:131-140.

59. Weiden PL, Breitz HB, Press O, et coll.: **Pretargeted radioimmunotherapy (PRIT) for treatment of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): initial phase I/II study results.** *Cancer Biother. Radiopharm* 2000, **15**:15-29.
60. Chang C, Sharkey RM, Rossi EA, et coll.: **Molecular advances in pretargeting radioimmunotherapy with bispecific antibodies.** *Mol. Cancer Ther* 2002, **1**:553-563.
61. Kraeber-Bodéré F, Faivre-Chauvet A, Ferrer L, et coll.: **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* 2003, **9**:3973S-81S.
62. Chatal J, Campion L, Kraeber-Bodéré F, et coll.: **Survival improvement in patients with medullary thyroid carcinoma who undergo pretargeted anti-carcinoembryonic-antigen radioimmunotherapy: a collaborative study with the French Endocrine Tumor Group.** *J. Clin. Oncol* 2006, **24**:1705-1711.
63. Hamoudeh M, Kamleh MA, Diab R, Fessi H: **Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer.** *Adv. Drug Deliv. Rev* 2008, **60**:1329-1346.
64. Mouglin-Degraef M, Bourdeau C, Jestin E, et coll.: **Doubly radiolabeled liposomes for pretargeted radioimmunotherapy.** *International Journal of Pharmaceutics* 2007, **344**:110-117.
65. Zalutsky M, Vaidyanathan G: **Astatine-211-labeled radiotherapeutics: an emerging approach to targeted alpha-particle radiotherapy.** *Curr Pharm Des* 2000, **6**:1433-55.
66. Regaud C, Lacassagne A: **La radiosensibilité cellulaire étudiée dans l'ensemble de ses manifestations.** *Radiophysiol Radiother* 1927:95-116.
67. Vuillez JP: **Radioimmunotargeting: diagnosis and therapeutic use.** *Bull Cancer* 2000, **87**:813-827.
68. Imam SK: **Advancements in cancer therapy with alpha-emitters: a review.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001, **51**:271-8.
69. Mc Devitt M, Sgouros G, Finn R, et coll.: **Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides.** *Eur J of Nucl Med* 1998, **25**:1341-1351.
70. Kozak RW, Atcher RW, Gansow OA, et coll.: **Bismuth-212-labeled anti-Tac monoclonal antibody: alpha-particle-emitting radionuclides as modalities for radioimmunotherapy.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1986, **83**:474-478.
71. Kaspersen FM, Bos E, Doornmalen AV, et coll.: **Cytotoxicity of ²¹³Bi- and ²²⁵Ac-immunoconjugates.** *Nucl Med Commun* 1995, **16**:468-476.
72. Jurcic JG, Larson SM, Sgouros G, et coll.: **Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia.** *Blood* 2002, **100**:1233-1239.

73. Bruland ØS, Nilsson S, Fisher DR, Larsen RH: **High-linear energy transfer irradiation targeted to skeletal metastases by the alpha-emitter ^{223}Ra : adjuvant or alternative to conventional modalities?** *Clin. Cancer Res* 2006, **12**:6250s-6257s.
74. Morzenti S, Bonardi ML, Groppi F, et coll.: **Cyclotron production of $^{211}\text{At}/^{211}\text{gPo}$ by $^{209}\text{Bi}(\alpha,2n)$ reaction.** *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 2008, **276**:843-847.
75. Schultz M, Hammond M, Cessna J, et coll.: **Assessing the ^{210}At impurity in the production of ^{211}At for radiotherapy by ^{210}Po analysis via isotope dilution alpha spectrometry.** *Appl Radiat Isot* 2006, **64**:1365-1369.
76. Fellman A, Ralston L, Hickman D, Ayres L, Cohen N: **Polonium metabolism in adult female baboons.** *Radiat Res* 1994, **137**:238-50.
77. Groppi F, Bonardi ML, Birattari C, et coll.: **Optimisation study of alpha-cyclotron production of $\text{At-}^{211}/\text{Po-}^{211}\text{g}$ for high-LET metabolic radiotherapy purposes.** *Appl Radiat Isot* 2005, **63**:621-31.
78. Lambrecht R, Mirzadeh S: **Cyclotron isotopes and radiopharmaceuticals—XXXV astatinenext term- 211 .** *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes* 1985, **36**:443-450.
79. ICRP: **ICRP Publication 61: Annuals Limits on Intakes of Radionuclides by Workers based on 1990 Recommendation.** *Annals of the ICRP* 1991.
80. Hermanne A, Tárkányi F, Takács S, et coll.: **Experimental study of the cross-sectionsnext term of α -particle induced reactions on ^{209}Bi .** *Applied Radiation and Isotopes* 2005, **63**:1-9.
81. Wilbur DS: **potential use of alpha emitting radionuclides in the treatment of cancer.** *Antibody Immunoconj Radiopharm* 1991, **4**:85-97.
82. Jardine L: **Decays of ^{211}At , ^{211}Po , and ^{207}Bi .** *Physical Review C. Nuclear Physics* 1975, **11**:1385-1391.
83. Lindencrona U, Nilsson M, Forssell-Aronsson E: **Similarities and differences between free ^{211}At and ^{125}I - transport in porcine thyroid epithelial cells cultured in bicameral chambers.** *Nucl Med Biol* 2001, **28**:41-50.
84. Zalutsky M, Reardon D, Pozzi OR, Vaidyanathan G, Bigner D: **Targeted α -particle radiotherapy with ^{211}At -labeled monoclonal antibodies.** *Nucl Med Biol* 2007.
85. Curtis L, Evans R: **The radiochemistry of astatine.** *US Atomic energy commission* 1960.
86. Johnson G, Leininger R, Segre E: **Chemical properties of astatine.** *The Journal of Chemical Physics* 1949, **17**:1-10.
87. Zalutsky M, Zhao XG, Alston K, Bigner D: **High-level production of alpha-particle-emitting (^{211}At) and preparation of (^{211}At)-labeled antibodies for clinical use.** *J Nucl Med* 2001, **42**:1508-15.

88. Lindegren S, Back T, Jensen H: **Dry-distillation of astatine-211 from irradiated bismuth targets: a time-saving procedure with high recovery yields.** *Appl Radiat Isot* 2001, **55**:157-60.
89. Yordanov A, Pozzi OR, Carlin S, et coll.: **Wet harvesting of no-carrier-added ^{211}At from an irradiated ^{209}Bi target for radiopharmaceutical applications.** *J. of Radioanalytical and nuclear chemistry* 2004, **262**:593-599.
90. Hamilton JG, Soley MH: **A Comparison of the Metabolism of Iodine and of Element 85 (Eka-Iodine).** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1940, **26**:483-9.
91. Hamilton J, Asling C, Garrison W, et coll.: **The destruction of thyrois tissue in the rat by the halogen, astatine.** *Proceedings of the forty-second annual meeting of the american society for clinical investigation* 1950:820.
92. Hamilton J: **Medical and health physics quarterly report.** *Radiation Laboratory of Berkeley, California* 1955:1-63.
93. Yokoro K, Kunii A, Furth J, Durbin P: **Tumor induction with astatine-211 in rats: Characterization of pituitary tumors.** *Cancer Res* 1964, **24**:683-688.
94. McLendon RE, Archer GE, Garg PK, Bigner D, Zalutsky M: **Radiotoxicity of systematically administered [^{211}At]astatide in B6C3F1 and BALB/c (nu/nu) mice: a long-term survival study with histologic analysis.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996, **35**:69-80.
95. Carlin S, Mairs RJ, Welsh P, Zalutsky M: **Sodium-iodide symporter (NIS)-mediated accumulation of [(^{211}At)]astatide in NIS-transfected human cancer cells.** *Nucl Med Biol* 2002, **29**:729-39.
96. Pourcher T, Lindenthal S, Basquin C, et coll.: **Le transporteur d'iode (NIS): nouvelles perspectives en oncologie nucléaire.** *Médecine Nucléaire* 2005, **29**:237-246.
97. Larsen RH, Slade S, Zalutsky M: **Blocking [^{211}At]astatide accumulation in normal tissues: preliminary evaluation of seven potential compounds.** *Nucl Med Biol* 1998, **25**:351-7.
98. Lindencrona U, Sillfors-Elverby L, Nilson M, Forssell-Aronsson E: **Adsorption and volatility of free ^{211}At and ^{125}I .** *Appl Radiat Isot* 2005, **62**:395-403.
99. Alkorta I, Blanco F, Solimannejad M, Elguero J: **Competition of Hydrogen Bonds and Halogen Bonds in Complexes of Hypohalous Acids with Nitrogenated Bases.** *The Journal of Physical Chemistry A* 2008, **112**:10856-10863.
100. Lide D: **Section 4: Propertie of the elements and inorganic compounds.** Dans *CRC Handbook of Chemistry and Physics 85th edition*. 2005:707-708.

101. Burda J, Hobza P, Zahradnik R: **Properties and reactivity in groups of the periodic system: ion-molecule reactions $HX + HX^+$ ($X = F, Cl, Br, I, At$).** *J Phys Chem* 1997, **101**:1134-1139.
102. Apparu M, Madelmont J: **Chapitre 1: Molécules marquées à l'iode radioactif.** Dans *Radiopharmaceutiques, chimie des radiotraceurs et applications biologiques*. Presse Universitaire de Grenoble. :249-305.
103. Kiser R: **Estimation of the ionization potential and dissociation energy of molecular astatine.** *The Journal of Chemical Physics* 1960:1265-1266.
104. Appelman E: **The oxidation states of astatine in aqueous solution.** 1961, **83**:805-807.
105. Huheey PJE, Keiter EA, Keiter RL, Pousse A, Fischer J: **Chapitre 17: La chimie des halogènes et des gaz rares.** Dans *Chimie inorganique*. :824-856.
106. Milanov M, Doberenz V, Khalkin V, Marinov A: **Chemical properties of positive singly charged astatine ion in aqueous solution.** *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 1984, **83**:291-299.
107. Visser G, Diemer E: **Inorganic astatine chemistry: formation of complexes of astatine.** *Radiochimica acta* 1983, **33**:145-151.
108. Greenwood N, Earnshaw A: **Chapter 17: The halogens: Fluorine, Chlorine, Bromine, Iodine and Astatine.** Dans *Chemistry of the elements*. Butterworth-Heinemann; 1997:789-887.
109. Ludwig R, Fischer S, Dreyer R: **Complex formation equilibria between astatine (I) and sulphur-containing chelating ligands.** *Polyhedron* 1991, **10**:11-17.
110. Dreyer R, Dreyer I, Fischer S, Hartmann H, Rösch F: **Synthesis and characterization of cationic astatine compounds with sulfur-containing ligand stable in aqueous solutions.** *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 1985, **96**:333-342.
111. Yordanov A, Deal K, Garmestani K, et coll.: **Synthesis and biodistribution study of a new ^{211}At -Calix-4-arene complex.** *J of labelled compounds and radiopharmaceuticals* 2000, **43**:1219-1225.
112. Fischer S, Dreyer R, Albrecht S: **Pseudohalogen compounds of astatine: synthesis and characterization of At/I -tricyanomethanide- and At/I -azide-compounds.** *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 1987, **117**:275-283.
113. Klapötke M, Schulz A: **The structure of astatine azide, AtN_3 - a theoretical study.** *Structural Chemistry* 1997, **8**:421-423.
114. Fischer S, Dreyer R, Hussein H, Weber M, Hartmann H: **Synthesis and first characterization of cationic At/I -compounds with selenium-containing neutral ligands.** *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 1987, **119**:181-191.

115. Milesz S, Jovchev M, Schumann D, Khalkin V, Milanov M: **The EDTA complexes of astatine.** *J of radioanal nucl chem* 1988, **127**:193-198.
116. Schumann D, Milesz S, Jovchev M, So B, Khalkin V: **Nitrilotriacetate complex of univalent astatine.** *Radiochimica acta* 1992, **56**:173-175.
117. Ludwig R, Dreyer R, Fischer S: **First investigations of complex formation of At(I) with phosphorous organic compounds.** *Radiochimica acta* 1989, **47**:129-130.
118. Pruszynski M, Bilewicz A, Was B, Petelencz B: **Formation and stability of astatide-mercury complexes.** *J of radioanal nucl chem* 2006, **268**:91-94.
119. Pruszynski M, Bilewicz A, Zalutsky M: **Preparation of Rh[16aneS4-diol](211)At and Ir[16aneS4-diol](211)At complexes as potential precursors for astatine radiopharmaceuticals. Part I: Synthesis.** *Bioconjug Chem* 2008, **19**:958-965.
120. Norseev Y, Bilewicz A, Pruszynski M: **211At-Rh(16-S4-diol) as a starting complex for preparing an astatine-labeled radiopharmaceutical.** *Radiochemistry* 2008, **50**:208-212.
121. Norseev Y, Nhan D, Khalkin V, Huan N, Vasaros L: **The preparation of astatine labelled tyrosine using an electrophilic reaction.** *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 1985, **94**:185-190.
122. Takahashi N, Otozai K: **The mechanism of the reaction of elementary astatine with organic solvents.** *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 1986, **103**:1-10.
123. Brown I, Mitchell JS: **The development of a [211AT]-astatinated endoradiotherapeutic drug: part IV--late radiation effects.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998, **40**:1177-83.
124. Brown I, Carpenter R, Link E, Mitchell J: **Potential diagnostic and therapeutic agents for malignant melanoma: Synthesis of heavy radiohalogenated derivatives of methylene blue by electrophilic and nucleophilic methods.** *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 1986, **107**:337-351.
125. Link EM, Brown I, Carpenter RN, Mitchell JS: **Uptake and Therapeutic Effectiveness of 125I- and 211At-Methylene Blue for Pigmented Melanoma in an Animal Model System.** *Cancer Res* 1989, **49**:4332-4337.
126. Link EM, Carpenter RN, Hansen G: **[211At]methylene blue for targeted radiotherapy of human melanoma xenografts: dose fractionation in the treatment of cutaneous tumours.** *Eur J Cancer* 1996, **32A**:1240-7.
127. Link EM, Michalowski A, Rosch F: **211-At-methylene blue for targeted radiotherapy of disseminated melanoma: microscopic analysis of tumour versus normal tissue damage.** *Eur J Cancer* 1996, **32A**:1986-1994.
128. Norseev Y: **Synthesis of astatine-tagged methylene blue, a compound for fighting micrometastases and individual cells of melanoma.** *J of radioanal nucl chem* 1998, **237**:155-157.

129. Pillai K, McLaughlin W, Lambrecht R, Bloomer W: **Carrier-free astatination of steroid hormones.** *J of labelled compounds and radiopharmaceuticals* 1987, **24**:1117-1122.
130. Rössler K, Tornau W, Stöcklin G: **Rapid separation of carrier-free inorganic and organic compounds of radioiodine and astatine by high-pressure liquid chromatography.** *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 1974, **21**:199-209.
131. Kozirowski J, Lebeda O, Weinreich R: **A cryotrap as flow reactor for synthesis of ²¹¹At labelled compounds.** *Appl Radiat Isot* 1999, **50**:527-529.
132. Vaidyanathan G, Zalutsky MR: **1-(m-[²¹¹At]astatobenzyl)guanidine: synthesis via astatate demetalation and preliminary in vitro and in vivo evaluation.** *Bioconjug Chem* 1992, **3**:499-503.
133. Vaidyanathan G, Affleck DJ, Zalutsky MR: **No-carrier added (4-Fluoro-3-¹³¹I-iodobenzyl)guanidine and (3-²¹¹At-astato-4-fluorobenzyl)guanidine.** *Bioconjug Chem* 1996, **1996**:102-107.
134. Vaidyanathan G, Friedman HS, Keir ST, Zalutsky MR: **Evaluation of meta-[²¹¹At]astatobenzylguanidine in an athymic mouse human neuroblastoma xenograft model.** *Nucl Med Biol* 1996, **23**:851-6.
135. Larsen RH, Murud KM, Akabani G, et coll.: **²¹¹At- and ¹³¹I-Labeled Bisphosphonates with High In Vivo Stability and Bone Accumulation .** *J Nucl Med* 1999, **40**:1197-1203.
136. Murud KM, Larsen RH, Bruland OS, Hoff P: **Influence of pretreatment with 3-amino-1-hydroxypropylidene-1,1-Biphosphonate (APB) on organ uptake of ²¹¹At and ¹²⁵I-labeled amidobiphosphonates in mice.** *Nucl Med Biol* 1999, **26**:791-794.
137. Murud KM, Larsen RH, Hoff P, Zalutsky M: **Synthesis, purification, and in vitro stability of ²¹¹At- and ¹²⁵I-labeled amidobiphosphonates.** *Nucl Med Biol* 1999, **26**:397-403.
138. Vaidyanathan G, Boskovitz A, Shankar S, Zalutsky M: **Radioiodine and ²¹¹At-labeled guanidinomethyl halobenzoyl octreotate conjugates: potential peptide radiotherapeutics for somatostatin receptor-positive cancers.** *Peptides* 2004, **25**:2087-97.
139. Vaidyanathan G, Affleck D, Schottelius M, et coll.: **Synthesis and evaluation of glycosylated octreotate analogues labeled with radioiodine and ²¹¹At via a tin precursor.** *Bioconjug Chem* 2006, **17**:195-203.
140. Vaidyanathan G, Affleck D, Welsh P, et coll.: **Radioiodination and astatination of octreotide by conjugation labeling.** *Nucl Med Biol* 2000, **27**:329-37.
141. Orlova A, Lebeda O, Tolmachev V, et coll.: **Closo-dodecaborate(2-)anion as a potential prosthetic group for attachment of astatine to proteins. Aspects of the labelling chemistry with chloramine T.** *J of labelled compounds and radiopharmaceuticals* 2000, **43**:251-260.

142. Sjostrom A, Tolmachev V, Lebeda O, et coll.: **Direct astatination of a tumor-binding protein, human epidermal growth factor, using nido-carborane as a prosthetic group.** *J. of Radioanalytical and nuclear chemistry* 2003, **256**:191-197.
143. Hadley S, Wilbur DS, Gray M, Atcher R: **Astatine-211 labeling of an antimelanoma antibody and its Fab fragment using N-succinimidyl p-astatobenzoate: comparisons in vivo with the p-125-I-iodobenzoyl conjugate.** *Bioconjug Chem* 1991, **2**:171-179.
144. Aaij C, Tschroots W, Lindner L, Feltkamp T: **The preparation of astatine labelled proteins.** *1975* 1975, **26**:25-30.
145. Vaughan A, fremlin J: **The preparation of astatine labelled proteins using an electrophilic reaction.** *Int J of Nucl Med and biol* 1978, **5**:229-230.
146. Visser G, Diemer E, Kaspersen F: **The nature of the astatine-protein bond.** *Int J of applied radiation and isotopes* 1981, **32**:905-912.
147. Milesz S, Norseev Y, Szucs Z, Vasaros L: **Characterisation of DTPA complexes and conjugated antibodies of astatine.** *J of radioanal nucl chem* 1989, **137**:365-372.
148. Ning L, Jiannan J, Shangwu M, Hengliu C, Yanping Y: **Preparation and preliminary evaluation of astatine 211 labeled IgG via DTPA anhydride.** *J. of Radioanalytical and nuclear chemistry* 1998, **227**:187-190.
149. Friedman A, Zalutsky M, Wung W, et coll.: **Preparation of a biologically stable and immunogenically competent astatinated protein.** *J of Nuclear Medicine* 1977, **4**:219-224.
150. Changhou Y, Jannan J, Shuyuan Z, et coll.: **Astatine-211 labelled proteins and their stability in vivo.** *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 1989, **129**:377-385.
151. Vaughan A, Bateman W, Cowan J: **The preparation and cytotoxic properties of 211At labelled concanavalin A bound to cell membranes.** *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 1981, **64**:33-39.
152. Wunderlich G, Fisher S, Dreyer R, Franke W: **A simple method for labelling proteins with 211At via diazotized aromatic diamine.** *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 1987, **117**:197-203.
153. Zalutsky M, Narula A: **Astatination of proteins using an N-succinimidyl tri-n-butylstannyl benzoate intermediate.** *Appl Radiat Isot* 1988, **39**:227-232.
154. Narula A, Zalutsky M: **No-carrier added astatination of N-succinimidyl-3-(tri-n-butylstannyl) benzoate (ATE) via electrophilic destannylation.** *Radiochimica acta* 1989, **47**:131-135.
155. Wilbur DS, Hylarides M, Fritzberg A: **Reactions of organometallic compounds with astatine-211. Application to protein labeling.** *Radiochimica acta* 1989, **47**:137-142.

156. Garg PK, Harrison CL, Zalutsky M: **Comparative tissue distribution in mice of the alpha-emitter 211At and 131I as labels of a monoclonal antibody and F(ab')₂ fragment.** *Cancer Res* 1990, **50**:3514-20.
157. Zalutsky M, Garg PK, Friedman A, Bigner D: **Labeling monoclonal antibodies and F(ab')₂ fragments with the alpha-particle-emitting nuclide astatine-211: preservation of immunoreactivity and in vivo localizing capacity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, **86**:7149-53.
158. Röhl C, Grell M, Maser E: **The organotin compounds trimethyltin (TMT) and triethyltin (TET) but not tributyltin (TBT) induce activation of microglia co-cultivated with astrocytes.** *Toxicol In Vitro* 2009.
159. Pozzi OR, Zalutsky M: **Radiopharmaceutical chemistry of targeted radiotherapeutics, part 1: effects of solvent on the degradation of radiohalogenation precursors by 211At alpha-particles.** *J Nucl Med* 2005, **46**:700-6.
160. Pozzi OR, Zalutsky M: **Radiopharmaceutical chemistry of targeted radiotherapeutics, part 2: Radiolytic effects of 211At alpha-particles influence N-succinimidyl 3-211At-astatobenzoate synthesis.** *J Nucl Med* 2005, **46**:1393-1400.
161. Pozzi OR, Zalutsky M: **Radiopharmaceutical chemistry of targeted radiotherapeutics, Part 3: a-particle-induced radiolytic effects on the chemical behavior of 211-At.** *J Nucl Med* 2007, **48**:1190-1196.
162. Garg PK, Alston KL, Zalutsky MR: **Catabolism of radioiodinated murine monoclonal antibody F(ab')₂ fragment labeled using N-succinimidyl 3-iodobenzoate and Iodogen methods.** *Bioconjug Chem* 1995, **6**:493-501.
163. Gnidehou S, Caillou B, Talbot M, et coll.: **Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site.** *FASEB J* 2004, **18**:1574-1576.
164. Láznicek M, Květina J, Sránek B, Kronrád L, Hradílek P: **Distribution and elimination of o-125I-benzoate in rats.** *Gen Physiol Biophys* 1983, **2**:279-85.
165. Laznicek M, Laznickova A: **Renal handling of iodobenzoates in rats.** *J Pharm Pharmacol* 1999, **51**:1019-23.
166. Garg PK, Slade SK, Harrison CL, Zalutsky MR: **Labeling proteins using aryl iodide acylation agents: influence of meta vs para substitution on in vivo stability.** *Int J Rad Appl Instrum B* 1989, **16**:669-73.
167. Garg S, Garg PK, Zalutsky M: **N-Succinimidyl 5-(trialkylstannyl)-3-pyridinecarboxylates: a new class of reagents for protein radioiodination.** *Bioconjug Chem* 1991, **2**:50-56.
168. Reist CJ, Foulon C, Alston K, Bigner D, Zalutsky M: **Astatine-211 labeling of internalizing anti-EGFRvIII monoclonal antibody using N-succinimidyl 5-[211At]astato-3-pyridinecarboxylate.** *Nucl Med Biol* 1999, **26**:405-11.

169. Talanov VS, Garmestani K, Regino CA, et coll.: **Preparation and in vivo evaluation of a novel stabilized linker for 211At labeling of protein.** *Nucl Med Biol* 2006, **33**:469-80.
170. Yordanov A, Garmestani K, Zhang M, et coll.: **Preparation and in vivo evaluation of linkers for 211At labeling of humanized anti-Tac.** *Nucl Med Biol* 2001, **28**:845-56.
171. Vaidyanathan G, Affleck D, Bigner D, Zalutsky M: **N-succinimidyl 3-[211At]astato-4-guanidinomethylbenzoate: an acylation agent for labeling internalizing antibodies with alpha-particle emitting 211At.** *Nucl Med Biol* 2003, **30**:351-9.
172. Talanov VS, Yordanov A, Garmestani K, et coll.: **Preparation and in vivo evaluation of novel linkers for 211At labeling of proteins.** *Nucl Med Biol* 2004, **31**:1061-71.
173. Foulon C, Schoultz BW, Zalutsky M: **Preparation and biological evaluation of an astatine-211 labeled biotin conjugate: biotiny-3-[211 At]astatoanilide.** *Nucl Med Biol* 1997, **24**:135-43.
174. Foulon C, Alston K, Zalutsky M: **Astatine-211-labeled biotin conjugates resistant to biotinidase for use in pretargeted radioimmunotherapy.** *Nucl Med Biol* 1998, **25**:81-8.
175. Wilbur DS, Chyan MK, Hamlin DK, et coll.: **Reagents for astatination of biomolecules: comparison of the in vivo distribution and stability of some radioiodinated/astatinated benzamidyl and nido-carboranyl compounds.** *Bioconjug Chem* 2004, **15**:203-23.
176. Wilbur DS, Chyan M, Hamlin DK, Perry MA: **Reagents for Astatination of Biomolecules. 3. Comparison of closo-Decaborate(2-) and closo-Dodecaborate(2-) Moieties as Reactive Groups for Labeling with Astatine-211.** *Bioconjug Chem* 2009.
177. Wesley JN, McGee EC, Garmestani K, et coll.: **Systemic radioimmunotherapy using a monoclonal antibody, anti-Tac directed toward the alpha subunit of the IL-2 receptor armed with the alpha-emitting radionuclides (212)Bi or (211)At.** *Nucl Med Biol* 2004, **31**:357-64.
178. Zhang Z, Zhang M, Garmestani K, et coll.: **Effective treatment of a murine model of adult T-cell leukemia using 211At-7G7/B6 and its combination with unmodified anti-Tac (daclizumab) directed toward CD25.** *Blood* 2006, **108**:1007-12.
179. Zhang M, Yao Z, Patel H, et coll.: **Effective therapy of murine models of human leukemia and lymphoma with radiolabeled anti-CD30 antibody, HeFi-1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:8444-8448.
180. Larsen RH, Hoff P, Vergote IB, et coll.: **Alpha-particle radiotherapy with 211At-labeled monodisperse polymer particles, 211At-labeled IgG proteins, and free 211At in a murine intraperitoneal tumor model.** *Gynecol Oncol* 1995, **57**:9-15.
181. Andersson H, Elgqvist J, Horvath G, et coll.: **Astatine-211-labeled antibodies for treatment of disseminated ovarian cancer: an overview of results in an ovarian tumor model.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**:3914S-21S.

182. McLendon RE, Archer GE, Larsen RH, et coll.: **Radiotoxicity of systemically administered ²¹¹At-labeled human/mouse chimeric monoclonal antibody: a long term survival study with histologic analysis.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999, **45**:491-499.
183. Nakamae H, Wilbur DS, Hamlin DK, et coll.: **Biodistributions, Myelosuppression, and Toxicities in Mice Treated with an Anti-CD45 Antibody Labeled with the {alpha}-Emitting Radionuclides Bismuth-213 or Astatine-211.** *Cancer Res* 2009:0008-5472.CAN-08-4363.
184. Zalutsky MR: **Targeted radiotherapy of brains tumours.** *British Journal of Cancer* 2004, **90**:1469-1473.
185. Zalutsky MR, Reardon DA, Akabani G, et coll.: **Clinical experience with a-particle-emitting ²¹¹-At: Treatment of recurrent brain tumor patients with ²¹¹-At-labeled chimeric antitenascin monoclonal antibody 81C6.** *J Nucl Med* 2008, **49**:30-38.
186. National Cancer Institute, USA: **Common Toxic Criteria (CTC) version 2.0.** http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/docs/ctcv20_4-30-992.pdf:consulté le 09/04/2009.
187. Cyrille Alliot, Michel Cherel, Jacques Barbet, Thierry Sauvage, Gilles Montavon: **Extraction of astatine-211 in diisopropylether (DIPE).** *Radiochimica acta* 2009, **97**:161-165.
188. C. Zona, M. L. Bonardi, F. Groppi, et coll.: **Wet-chemistry method for the separation of no-carrier-added ²¹¹At/²¹¹gPo from ²⁰⁹Bi target irradiated by alpha-beam in cyclotron.** *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 2008, **276**:819-824.
189. Champion J, Alliot C, Huclier S, et coll.: **Determination of stability constants between complexing agents and At(I) and At(III) species present at ultra-trace concentrations.** *Inorganica Chimica Acta* 2009, **362**:2654-2661.
190. Araujo EB, Santos JS, Colturato MT, Muramoto E, Silva CPG: **Optimization of a convenient route to produce N-succinimidyl 4-radiodobenzoate for radioiodination of proteins.** *Applied Radiation and Isotopes* 2003, **58**:667-673.
191. Zalutsky MR, Narula AS: **A method for the radiohalogenation of proteins resulting in decreased thyroid uptake of radioiodine.** *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part A. Applied Radiation and Isotopes* 1987, **38**:1051-1055.
192. Wilbur DS: **Radiohalogenation of proteins: an overview of radionuclides, labeling methods, and reagents for conjugate labeling.** *Bioconjug Chem* 1992, **3**:433-70.
193. Lindmo T, Boven E, Cuttitta F, Fedorko J, Jr PB: **Determination of the immunoreactive function of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess.** *Journal of Immunological Methods* 1984, **72**:77-89.

194. Caglar M, Tuncel M, Alpar R: **Scintigraphic evaluation of salivary gland dysfunction in patients with thyroid cancer after radioiodine treatment.** *Clin Nucl Med* 2002, **27**:767-771.
195. Lindegren S, Andersson H, Jacobsson L, et coll.: **Synthesis and biodistribution of ²¹¹At-labeled, biotinylated, and charge-modified poly-L-lysine: evaluation for use as an effector molecule in pretargeted intraperitoneal tumor therapy.** *Bioconjug Chem* 2002, **13**:502-9.
196. Carlin S, Akabani G, Zalutsky M: **In vitro cytotoxicity of (²¹¹At)-astatide and (¹³¹I)-iodide to glioma tumor cells expressing the sodium/iodide symporter.** *J Nucl Med* 2003, **44**:1827-38.
197. Petrich T, Helmeke HJ, Meyer GJ, Knapp WH, Potter E: **Establishment of radioactive astatine and iodine uptake in cancer cell lines expressing the human sodium/iodide symporter.** *Eur J of Nucl Med* 2002, **29**:842-854.
198. Lindegren S, Frost S, Bäck T, et coll.: **Direct procedure for the production of ²¹¹At-labeled antibodies with an epsilon-lysyl-3-(trimethylstannyl)benzamide immunoconjugate.** *J Nucl Med* 2008, **49**:1537-45.
199. Newton AS: **Some Aspects of the Radiolysis of Isopropyl Ether.** *The Journal of Physical Chemistry* 1957, **61**:1490-1496.
200. Newton AS: **A Survey of the Radiation Chemistry of Some Aliphatic Ethers.** *The Journal of Physical Chemistry* 1957, **61**:1485-1490.
201. Visser G: **Inorganic astatine chemistry; Part II: The chameleon behaviour and electrophilicity of At-species.** *Radiochimica acta* 1989, **47**:97-103.
202. Elgqvist J, Andersson H, Bernhardt P, et coll.: **Administered activity and metastatic cure probability during radioimmunotherapy of ovarian cancer in nude mice with (²¹¹At)-MX35 F(ab')(2).** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006, **66**:1228-37.
203. Elgqvist J, Andersson H, Back T, et coll.: **Therapeutic efficacy and tumor dose estimations in radioimmunotherapy of intraperitoneally growing OVCAR-3 cells in nude mice with ²¹¹At-labeled monoclonal antibody MX35.** *J Nucl Med* 2005, **46**:1907-1915.
204. Vaidyanathan G, Affleck DJ, Alston K, et coll.: **A kit method for the high level synthesis of ²¹¹At MABG.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2007, **15**:3430-3436.

ANNEXES

Annexe n°1 : Publication du candidat

Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals
2008, 51 379-383

Feasibility of the radioastatination of a monoclonal antibody with
astatine-211 purified by wet extraction

Mickaël Bourgeois, François Guerard, Cyrille Alliot,
Marie Mougin-Degraef, Holisoa Rajérison, Patricia Remaud-Le Saëc,
Jean-François Gestin, François Davodeau, Michel Chérel,
Jacques Barbet, and Alain Faivre-Chauvet

Annexe n°2 : Isotopes de l'astate

Isotope	½ vie	Emission
¹⁹¹ At	1,7 ms	α (100%)
¹⁹³ At	28 ms	α (100%)
¹⁹⁴ At	40 ms	α (n.d.%) ; ε (n.d.%)
¹⁹⁵ At	328 ms	α (100%)
¹⁹⁶ At	388 ms	α (95,1%) ; ε (4,9%)
¹⁹⁷ At	388 ms	α (96,1%) ; ε (3,9%)
¹⁹⁸ At	4,2 s	α (90,0%) ; ε (10,0%)
¹⁹⁹ At	7,03 s	α (90,0%) ; ε (10,0%)
²⁰⁰ At	43 s	α (52,0%) ; ε (48,0%)
²⁰¹ At	85,2 s	α (71,0%) ; ε (29,0%)
²⁰² At	184 s	α (37,0%) ; ε (63,0%)
²⁰³ At	7,4 min	α (31,0%) ; ε (69,0%)
²⁰⁴ At	9,2 min	α (3,8%) ; ε (96,2%)
²⁰⁵ At	26,9 min	α (10,0%) ; ε (90,0%)
²⁰⁶ At	30,6 min	α (0,9%) ; ε (99,1%)
²⁰⁷ At	1,8 h	α (8,6%) ; ε (91,4%)
²⁰⁸ At	1,63 h	α (0,6%) ; ε (99,4%)
²⁰⁹ At	5,41 h	α (4,1%) ; ε (95,9%)
²¹⁰ At	8,1 h	α (0,2%) ; ε (99,8%)
²¹¹ At	7,2 h	α (41,8%) ; ε (58,2%)
²¹² At	314 ms	α (100,0%) ; ε (<0,03%)
²¹³ At	125 ns	α (100%)
²¹⁴ At	558 ns	α (100%)
²¹⁵ At	0,1 ms	α (100%)
²¹⁶ At	0,3 ms	α (100%)
²¹⁷ At	32,3 ms	α (99,9%) ; ε (7,0.10 ⁻³ %)
²¹⁸ At	1,5 s	α (99,9%) ; β ⁻ (0,1%)
²¹⁹ At	56 s	α (97,0%) ; β ⁻ (3,0%)
²²⁰ At	3,71 min	α (8,0%) ; β ⁻ (92,0%)
²²¹ At	2,3 min	β ⁻ (100,0%)
²²² At	54 s	β ⁻ (100,0%)
²²³ At	50 s	β ⁻ (100,0%)

Annexes n°3 : Emissions de l'astate-211

Emissions particulières (particules alpha, électrons Auger et électron de conversion interne)

Types de particules	Voie d'émission	Énergie (keV)	Particules émises par désintégration d'un atome d' ²¹¹ At	Dose (MeV/Bq.s)	
α	²¹¹ At → ²⁰⁷ Bi	4997	4,180.10 ⁻⁶	2,089.10 ⁻⁵	
		5141	1,0.10 ⁻⁵	4,9.10 ⁻⁵	
		5210	3,6.10 ⁻⁵	1,9.10 ⁻⁴	
		5869,5	4,18.10 ⁻¹	2,453	
	²¹¹ Po → ²⁰⁷ Pb	6568,3	3,16.10 ⁻³	2,1.10 ⁻²	
		6891,5	3,36.10 ⁻³	2,3.10 ⁻²	
		7450,3	5,75.10 ⁻¹	4,288	
Électrons Auger	²¹¹ At → ²⁰⁷ Bi	8,15	1,12.10 ⁻⁶	9,1.10 ⁻⁹	
		58,2	6,7.10 ⁻⁸	3,9.10 ⁻⁹	
	²⁰⁷ Bi → ²⁰⁷ Pb	7,97	2,27.10 ⁻¹	1,8.10 ⁻³	
		56,7	1,2.10 ⁻²	6,87.10 ⁻⁴	
	²¹¹ At → ²¹¹ Po	8,33	1,6.10 ⁻¹	1,34.10 ⁻³	
		59,7	9,1.10 ⁻³	5,4.10 ⁻⁴	
	²¹¹ Po → ²⁰⁷ Pb	7,97	7,74.10 ⁻²	6,2.10 ⁻⁷	
		56,7	4,48.10 ⁻⁵	2,54.10 ⁻⁷	
Électrons de conversion interne	²¹¹ At → ²⁰⁷ Bi	579,07	1,6.10 ⁻⁶	9,0.10 ⁻⁷	
		652,2	3,1.10 ⁻⁷	2,1.10 ⁻⁷	
		653,21	2,7.10 ⁻⁷	1,7.10 ⁻⁷	
		726,3	5,4.10 ⁻⁸	3,9.10 ⁻⁸	
	²⁰⁷ Bi → ²⁰⁷ Pb	240,09	9,1.10 ⁻⁷	2,2.10 ⁻⁷	
		312,23	1,55.10 ⁻⁷	4,8.10 ⁻⁸	
		324,24	3,6.10 ⁻⁸	1,2.10 ⁻⁸	
		327,2	1,2.10 ⁻⁸	3,8.10 ⁻⁹	
		481,6935	6,3.10 ⁻³	3,0.10 ⁻³	
		553,8372	1,83.10 ⁻³	1,0.10 ⁻³	
		565,8473	6,14.10 ⁻⁴	3,5.10 ⁻⁴	
		809,8	1,1.10 ⁻⁵	8,9.10 ⁻⁶	
		881,94	1,86.10 ⁻⁶	1,6.10 ⁻⁶	
		975,651	2,9.10 ⁻²	2,9.10 ⁻²	
		1047,795	7,7.10 ⁻³	8,1.10 ⁻³	
		1059,805	2,3.10 ⁻³	2,4.10 ⁻³	
		1354,2	1,48.10 ⁻⁶	2,0.10 ⁻⁶	
		1426,34	2,3.10 ⁻⁷	3,3.10 ⁻⁷	
		1682,224	1,0.10 ⁻⁴	1,7.10 ⁻⁴	
		1754,367	1,42.10 ⁻⁵	2,5.10 ⁻⁵	
	²¹¹ At → ²¹¹ Po	593,9	1,2.10 ⁻⁴	7,1.10 ⁻⁵	
		670,06	2,06.10 ⁻⁵	1,38.10 ⁻⁵	
	²¹¹ Po → ²⁰⁷ Pb	240,2	5,2.10 ⁻⁶	1,3.10 ⁻⁶	
		312,34	9,3.10 ⁻⁷	2,9.10 ⁻⁷	
		324,35	2,1.10 ⁻⁷	6,98.10 ⁻⁸	
		327,31	6,98.10 ⁻⁸	2,3.10 ⁻⁸	
		481,65	5,1.10 ⁻⁵	2,4.10 ⁻⁵	
		553,79	1,4.10 ⁻⁵	7,8.10 ⁻⁶	
		809,8	6,6.10 ⁻⁵	5,3.10 ⁻⁵	
		891,94	1,1.10 ⁻⁵	9,7.10 ⁻⁶	
	β ⁺	²⁰⁷ Bi → ²⁰⁷ Pb	Emoy = 383,3	5,016.10 ⁻⁵	1,92.10 ⁻⁵
			Emax = 806,5		

Emissions électromagnétiques γ et X consécutives à une désintégration d' ^{211}At

Types de rayonnement	Voie d'émission	Énergie (keV)	Particules par désintégration	Dose (MeV/Bq.s)
γ	$^{211}\text{At} \rightarrow ^{207}\text{Bi}$	669,6	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$2,3 \cdot 10^{-5}$
		742,7	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$7,1 \cdot 10^{-6}$
	$^{207}\text{Bi} \rightarrow ^{207}\text{Pb}$	328,09	$3,2 \cdot 10^{-6}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$
		511	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$5,1 \cdot 10^{-5}$
		569,698	$4,09 \cdot 10^{-1}$	$2,3 \cdot 10^{-1}$
		897,8	$5,5 \cdot 10^{-4}$	$4,9 \cdot 10^{-4}$
		1063,656	$3,12 \cdot 10^{-1}$	$3,32 \cdot 10^{-1}$
		1442,2	$5,5 \cdot 10^{-4}$	$7,9 \cdot 10^{-4}$
	$^{211}\text{At} \rightarrow ^{211}\text{Po}$	1770,228	$2,9 \cdot 10^{-3}$	$5,1 \cdot 10^{-2}$
		687	$2,61 \cdot 10^{-3}$	$1,79 \cdot 10^{-3}$
$^{211}\text{Po} \rightarrow ^{207}\text{Pb}$	328,2	$1,9 \cdot 10^{-5}$	$6,3 \cdot 10^{-6}$	
	569,65	$3,2 \cdot 10^{-3}$	$1,8 \cdot 10^{-3}$	
	897,8	$3,3 \cdot 10^{-3}$	$2,9 \cdot 10^{-3}$	
X	$^{211}\text{At} \rightarrow ^{207}\text{Bi}$	10,8	$7,2 \cdot 10^{-7}$	$7,8 \cdot 10^{-9}$
		74,815	$5,2 \cdot 10^{-7}$	$3,9 \cdot 10^{-8}$
		77,107	$8,7 \cdot 10^{-7}$	$6,7 \cdot 10^{-8}$
		86,83	$1,05 \cdot 10^{-7}$	$9,1 \cdot 10^{-9}$
		87,349	$2,0 \cdot 10^{-7}$	$1,8 \cdot 10^{-8}$
		89,784	$7,4 \cdot 10^{-8}$	$6,6 \cdot 10^{-9}$
	$^{207}\text{Bi} \rightarrow ^{207}\text{Pb}$	10,6	$1,4 \cdot 10^{-1}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$
		72,805	$8,9 \cdot 10^{-2}$	$6,5 \cdot 10^{-3}$
		74,969	$1,5 \cdot 10^{-1}$	$1,1 \cdot 10^{-2}$
		84,45	$1,8 \cdot 10^{-2}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$
		84,938	$3,46 \cdot 10^{-2}$	$2,9 \cdot 10^{-3}$
		87,3	$1,3 \cdot 10^{-2}$	$1,1 \cdot 10^{-3}$
	$^{211}\text{At} \rightarrow ^{211}\text{Po}$	11,1	$1,08 \cdot 10^{-1}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$
		76,863	$7,22 \cdot 10^{-2}$	$5,55 \cdot 10^{-3}$
		79,29	$1,202 \cdot 10^{-1}$	$9,53 \cdot 10^{-3}$
		82,256	$1,45 \cdot 10^{-2}$	$1,3 \cdot 10^{-3}$
		89,807	$2,79 \cdot 10^{-2}$	$2,51 \cdot 10^{-3}$
		92,317	$1,030 \cdot 10^{-2}$	$9,51 \cdot 10^{-4}$
	$^{211}\text{Po} \rightarrow ^{207}\text{Pb}$	10,6	$4,7 \cdot 10^{-5}$	$5,0 \cdot 10^{-7}$
		72,805	$3,4 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-6}$
		74,969	$5,6 \cdot 10^{-5}$	$4,2 \cdot 10^{-6}$
		84,45	$6,8 \cdot 10^{-6}$	$5,75 \cdot 10^{-7}$
		84,938	$1,3 \cdot 10^{-5}$	$1,1 \cdot 10^{-6}$
87,3		$4,8 \cdot 10^{-6}$	$4,2 \cdot 10^{-7}$	

INDEX
des figures et
des tableaux

Figure n°1 : Effets directs et indirects des rayonnements ionisants sur une molécule d'ADN.....	p 15
Figure n°2 : Effets des rayonnements ionisants sur une cellule et mécanismes orientant la cellule vers l'apoptose.....	p 17
Figure n°3 : Phase et événements majeurs du cycle cellulaire.	p 18
Figure n°4 : Devenir des cellules et réparations possibles après une irradiation.....	p 19
Figure n°5 : Représentation de la courbe de survie cellulaire en fonction de la dose de rayonnement ionisant (en Gray).	p 23
Figure n°6 : Electrophorèse des protéines plasmatiques.....	p 28
Figure n°7 : Représentation schématique d'une immunoglobuline.	p 29
Figure n°8 : Configuration spatiale des sites épitopiques.	p 32
Figure n°9 : Production d'anticorps monoclonaux selon la méthode de Kohler et Milstein	p 35
Figure n°10 : Production d'anticorps chimériques souris-humains.....	p 37
Figure n°11 : Anticorps monoclonaux modifiés.....	p 37
Figure n°12 : Sites de clivages d'une immunoglobuline par la papaïne et par la pepsine et différents fragments obtenus.....	p 38
Figure n°13 : Représentation des différentes formes d'anticorps avec leurs sites de liaisons à l'antigène.....	p 39
Figure n°14 : Irradiation d'une cellule cancéreuse par un anticorps radiomarqué.....	p 44
Figure n°15 : Couplage direct et indirect d'un radionucléide à une structure protéique...	p 45
Figure n°16 : Physiologie vasculaire d'une tumeur, nécrose et diffusion médicamenteuse.....	p 48
Figure n°17 : Caractéristiques pathologiques de la vascularisation tumorale.....	p 48
Figure n°18 : Système 3 temps reposant sur l'affinité Avidine-Biotine.	p 56
Figure n°19 : Stratégie en 2 temps dit « Affinity Enhancement System » avec utilisation d'un anticorps bispécifique et d'un haptène radiomarqué.....	p 57
Figure n°20 : Haptène di-DTPA-TL-In marqué à l'iode-131.	p 58
Figure n°21 : Evolution de l'effet biologique relatif (EBR) en fonction du transfert d'énergie linéique.....	p 59
Figure n°22 : Différence de trajet et de densité d'ionisation entre l'iode-131 (émetteur β^-) et le bismuth-213 (émetteur α).....	p 60
Figure n°23 : comparaison RIT α / RIT β^- par représentation de la survie relative (%) en fonction de l'activité volumique dans le milieu.	p 60
Figure n°24 : Représentation des sections efficaces des réactions nucléaires de bombardement de bismuth-209 en fonction de l'énergie des particules alpha incidentes.....	p 65

Figure n°25 : schéma de désintégration de l'astate-211.....	p 66
Figure n°26 : Spectrométrie alpha d'un échantillon d'astate-211.....	p 67
Figure n°27 : Spectrométrie X et gamma d'un échantillon d'astate-211.....	p 68
Figure n°28 : Extraction par sublimation de l'astate-211.....	p 69
Figure n°29 : biodistribution en pourcentage de dose injectée par gramme de tissu pour l'astate-211 et l'iode-131 à 1 heure et 4 heures après injection.	p 71
Figure n°30 : différents états et potentiels redox de l'astate.....	p 72
Figure n°31 : complexe de $^{211}\text{At-M}(16\text{-S4-diol})$	p 76
Figure n°32 : Analogue de la somatostatine de type octreotide marqué à l'astate-211...	p 82
Figure n°33 : Structure closo-dodécaborate et nido-carborane.....	p 82
Figure n°34 : marquage d'une protéine en 2 étapes à l'astate-211 par l'intermédiaire d'un sel de diazonium.	p 84
Figure n°35 : Marquage d'une protéine en 2 étapes à l'astate-211 par l'intermédiaire d'une réaction de démétallation électrophile.	p 84
Figure n°36 : Métabolites radiomarqués à l'astate-211 retrouvés dans la circulation générale.....	p 86
Figure n°37 : Biotine radiomarqué à l'astate-211 et forme resistente à la biotinidase....	p 87
Figure n°38 : Biodistribution d'une IgG entière marquée à l'astate-211.....	p 91
Figure n°39 : Biodistribution de fragments F(ab')_2 marqué à l'astate-211.....	p 92
Figure n°40 : Biodistribution d'IgG spécifique d'une tumeur marquée à l'astate-211.....	p 93
Figure n°41 : Marquage d'anticorps par de l'astate-211 en 2 étapes.	p 97
Figure n°42 : Réaction nucléaire de production d'astate-211 : $^{209}\text{Bi} (\alpha,2n) ^{211}\text{At}$	p 99
Figure n°43 : paramètres de la cible solide de bismuth-209 (support en cuivre)	p 99
Figure n°44 : Extraction liquide d'astate-211 par attaque acide et extraction organique.	p 101
Figure n°45 : Evolution en % de l'activité résiduelle sur la cible	p 102
Figure n°46 : Evolution de la polarité des formes d'astate-211 dans le di-isopropylether en fonction du temps après l'extraction.	p 105
Figure n°47 : Ester d'étain activé bifonctionnel.....	p 106
Figure n°48 : Réaction de préparation de l'ester 3-trimethylstannylbenzoate de N-hydrosuccinimidyle.	p 107
Figure n°49 : acide 3-trimethylstannylbenzoïque.....	p 111
Figure n°50 : ester 3-trimethylstannylbenzoate de N-hydroxysuccinimidyle	p 111
Figure n°51 : Analyse chromatographique des références acide ^{125}I 3-iodobenzoïque et ester ^{125}I 3-iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle.....	p 113

Figure n°52 : Analyse chromatographique de l'acide [²¹¹ At]3-astatobenzoïque et de l'ester [²¹¹ At]3-astatobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle.....	p 114
Figure n°53 : Compétition entre le marquage de l'anticorps et la réaction d'hydrolyse de l'ester.	p 117
Figure n°54 : exemple de profil d'élution sur gel exclusion d'une immunoglobuline entière.	p 123
Figure n°55 : CCM sur ITLC-SG élué par de l'acide trichloracétique 10 % d'une IgG entière marquée à l'astate-211.	p 126
Figure n°56 : Profil d'élution de gel exclusion sur colonne NAP-5 d'une immunoglobuline marquée à l'astate-211.	p 126
Figure n°57 : Pureté radiochimique de l'anticorps marqué à l'astate-211.	p 127
Figure n° 58 : Stabilité sérique d'une immunoglobuline marquée à l'astate-211.	p 131
Figure n°59 : profil d'élution sur colonne Sephadex® de type NAP-5 d'un mélange BSA / acide 3-[²¹¹ At]astatobenzoïque après 6 et 12 heures d'incubation.	p 132
Figure n°60 : Résultats des tests d'immunoréactivité sur les fragments F(ab') ₂ marqués par l'ester 3-[²¹¹ At]astatobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle et 4-[²¹¹ At]astatobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle en fonction du temps et de la température d'incubation.	p 135
Figure n°61 : biodistribution d'une IgG entière marquée à l'iode-125 représenté en pourcentage de dose injectée par gramme.	p 139
Figure n°62 : biodistribution d'un fragment F(ab') ₂ marqué à l'iode-125 représenté en pourcentage de dose injectée par gramme.	p 140
Figure n°63 : biodistribution d'une IgG entière marquée à l'astate-211 représenté en pourcentage de dose injectée par gramme.	p 141
Figure n°64 : biodistribution d'un fragment F(ab') ₂ marqué à l'astate-211 représenté en pourcentage de dose injectée par gramme.	p 142
Tableau n°1 : Incidence des lésions à l'ADN par Gray et par cellule	p 16
Tableau n°2 : facteurs de pondération W _T en fonction de la radiosensibilité des tissus.	p 25
Tableau n°3 : Facteurs de pondération W _R en fonction de la nature du rayonnement... ..	p 25
Tableau n°4 : Propriété des différents isotopes d'immunoglobulines.....	p 31
Tableau n°5 : Caractéristiques pharmacologiques des différentes formes d'anticorps... ..	p 40
Tableau n°6 : Nomenclature internationale des anticorps monoclonaux.....	p 41
Tableau n°7 : Radionucléide émetteurs β ⁻ à potentiel thérapeutique.....	p 44

Tableau n°8 : efficacité du traitement au Bexxar® chez des patients présentant un lymphome malin non-Hodgkinien réfractaire/récidivant après chimiothérapie (en situation non myeloablative).....	p 52
Tableau n°9 : efficacité du traitement au Zevalin® comparé au traitement immunothérapeutique Rituximab chez des patients présentant un lymphome malin non-Hodgkinien.....	p 53
Tableau n°10 : principaux isotopes émetteurs de particules α utilisables en clinique. ...	p 63
Tableau n°11 : Energie et intensité des particules alpha émises par l'astate-211.....	p 67
Tableau n°12 : comparaison des paramètres physico-chimiques des halogènes.....	p 72
Tableau n°13 : différents agents complexant de l'astate.....	p 75
Tableau n°14 : Energie des liaisons carbone - halogène (C – X) en kJ/mol.....	p 76
Tableau n°15 : réactions chimiques permettant d'halogéner une molécule organique...	p 79
Tableau n°16 : Molécules organiques marquées à l'astate-211.	p 81
Tableau n°17 : Optimisation de la réaction de démétallation électrophile.....	p 85
Tableau n°18 : groupements prosthétiques utilisés pour marquer des structures protéiques à l'astate-211.....	p 88
Tableau n°19 : titrimétrie acide de la solution de di-isopropylether d'extraction.....	p 104
Tableau n°20 : paramètres de l'étude d'impact du volume réactionnel.....	p 110
Tableau n°21 : Résultats des études paramétriques de marquage du groupement prosthétique à l'astate-211.	p 115
Tableau n°22 : résultats de l'étude d'hydrolyse de l'ester.....	p 122
Tableau n°23 : Résultats de l'étude multiparamétrique de couplage entre l'ester 3- ^[125] I]iodobenzoate de N-hydroxysuccinimidyle et une immunoglobuline.	p 124
Tableau n°24 : résultats des marquages d'une IgG entière et d'un fragment F(ab') ₂ à l'astate-211.	p 127

La radio-immunothérapie α est une thérapie anticancéreuse prometteuse qui consiste à vectoriser des radionucléides émetteurs de particules α à l'aide d'agents immunospécifiques de certaines tumeurs afin de les détruire.

La première partie de ce travail présente les différentes caractéristiques conditionnant la réussite de la radio-immunothérapie en replaçant cette approche thérapeutique originale dans l'arsenal anti-cancéreux. Au cours de ces dernières années, l'astate-211 est apparu comme l'un des isotopes émetteurs de particules α les plus intéressants. L'ensemble des caractéristiques chimiques, physiques, biologiques ainsi que les différents essais de couplage à des immunovecteurs sont analysés dans cette partie.

La seconde partie de ce mémoire a pour but d'évaluer la faisabilité de marquage d'une structure protéique de type immuno-vecteur (immunoglobuline entière ou fragment de type $F(ab')_2$) avec de l'astate-211 produit par irradiation cyclotron et extrait de sa cible par une voie originale d'extraction liquide (attaque par de l'acide nitrique). Cette étude expérimentale a permis d'optimiser ce type de marquage en vue d'obtenir un immunovecteur fonctionnel et suffisamment stable *in vivo* pour envisager une étude pré-clinique.

Mots clés : *radio-immunothérapie α , astate-211, extraction liquide, oncologie, radiopharmaceutique*

Alpha radio-immunotherapy is a promising cancer therapy that uses α -particles vectorized by monoclonal antibody to break down cancerous tumours.

The first part of this work presents the different factors that affect the success of radio-immunotherapy in cancer treatment. Specifically we concentrate on astatine-211, an α particle emitting isotope that has shown great promise for cancer treatment. The different studies of the immuno-vectorisation of this isotope are also presented in this section.

The second part of this thesis aims to evaluate the feasibility of immunoglobulin labelling (full or $F(ab')_2$ fragment) with astatine-211. The labelling took place using a cyclotron irradiation to produce astatine-211 which was subsequently extracted by treating the target with nitric acid. This experimental study allowed us to optimize the labelling process to an *in vivo* stable immunoglobulin labelled with astatine-211 such that a pre-clinical study is plausible.

Keywords : *α -radioimmunotherapy, 211-astatine, wet extraction, oncology, radiopharmaceutic*